

**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF  
ANTI-KANKER DARI EKSTRAK ETANOL KULIT  
BATANG KAYU BITTI (*Vitex cofassus*)**



**Skripsi**

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
pada Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi  
UIN Alauddin Makassar

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
**ALAUDDIN**  
MAKASSAR  
Oleh  
**NURAINI**  
**60500110028**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UIN ALAUDDIN MAKASSAR**

**2014**

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Mahasiswa yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Nuraini  
NIM : 60500110028  
Tempat/Tgl.Lahir : Parado-Bima/11 Mei 1992  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Alamat : Jalan Mannuruki 2 lorong 3A Makassar  
Judul : “Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Antikanker  
Dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*)”

Menyatakan dengan sesungguhnya dan penuh kesadaran bahwa skripsi ini benar adalah hasil karya sendiri. Jika dikemudian hari terbukti bahwa ini merupakan duplikat, tiruan, plagiat, atau dibuat oleh orang lain, sebagian atau seluruhnya maka skripsi dan gelar yang diperoleh karenanya batal demi hukum.

Samat-Gowa, 11 Desember 2014

Penyusun

Nuraini  
Nim:60500110028

## PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul “Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Antikanker dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*),” yang disusun oleh Nuraini, NIM : 60500110028, Mahasiswa Jurusan Kimia pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, telah diuji dan dipertahankan dalam sidang munaqasyah yang diselenggarakan pada Senin, tanggal 11 Desember 2014 M, bertepatan dengan 18 Shafar 1436 H, dinyatakan telah dapat diterima sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana dalam Sains dan Teknologi, Jurusan Kimia (dengan beberapa perbaikan).

Samata-Gowa, 11 Desember 2014 M  
18 Shafar 1436 H

### DEWAN PENGUJI:

Ketua	: Dr. Muhammad Khalifah Mustami, M.Pd	(.....)
Sekretaris	: Dr. Ir. A. Suarda, M.Si	(.....)
Munaqisy I	: Aisyah, S.Si., M.Si	(.....)
Munaqisy II	: Maswati Baharuddin, S.Si., M.Si	(.....)
Munaqisy III	: Dr. Tasmin Tangngareng, M.Ag	(.....)
Pembimbing I	: Asriani Ilyas, S.Si., M.Si	(.....)
Pembimbing II	: Iin Novianty, S.Si., M.Sc	(.....)

Diketahui oleh:  
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi  
UIN Alauddin Makassar,

  
**Dr. Muhammad Khalifah Mustami, M.Pd**  
Nip. 19711204 200003 1 001

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan Syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Swt. Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas curahan rahmat dan hidayah\_Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Antikanker dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*)**”. Tak lupa penulis kirimkan salam dan salawat atas junjungan alam Nabi besar Muhammad Saw. beserta keluarga dan para sahabatnya.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Sarjana Sains (S.Si) pada Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan serta motivasi dari segala pihak penyusunan skripsi ini tidak dapat terselesaikan. Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua tercinta Ayahanda Yahya dan Ibunda Suhartati atas do’a dan dukungan morilnya. Pada kesempatan ini penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof.Dr.H.A.Qadir gassing, HT.,MS selaku rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar.
2. Bapak Dr.Muhammad Khalifah Mustami.,M.Pd selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi.
3. Ibu Maswati Baharuddin, S.Si.,M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar sekaligus sebagai penguji II.



4. Ibu Asriyani Ilyas, S.Si.,M.Si selaku dosen Pembimbing I dan Ibu Iin Novianty, S.Si.,M.Sc selaku dosen pembimbing II atas kesediaan dan keikhlasan dalam membimbing sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
5. Ibu Aisyah,S.Si.,M.Si selaku dosen penguji I yang telah memberikan masukan dan saran.
6. Bapak Dr. Tasmin Tangngareng.,M.Ag selaku dosen penguji III
7. Segenap Bapak dan Ibu dosen yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu serta staf Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar kak Musyawirah S.Pdi.
8. Segenap kakak laboran terkhusus untuk Kak Fitria Azis S.Si.,S.Pd, Kak Andi Nurahma S.Si, yang selalu memberikan masukan, saran, bimbingan selama penelitian sampai penyusunan akhir dan juga Kak Ismawanti S.Si, kak Ahmad Yani S.Si dan Kak Awaluddin S.Si.
9. Kedua adik penulis Anis dan Nana dan semua keluarga yang mendo'akan yang terbaik untuk penulis.
10. Terima kasih penulis ucapkan terkhusus kepada kak Wahyuni S.Si atas bantuannya serta Kak Armis Laboran Farmasi, Kak Nurdiah Asdar S.Si dan Ibu Tini selaku Laboran Laboratorium Kimia Organik UNHAS yang telah membantu melancarkan penulis melakukan penelitian.
11. Kedua Teman seperjuangan penelitian dalam suka maupun duka Neng Irmayanti dan Neng Ona Istiqama dan teman-teman khususnya Organik Team “joja” (Uni, Amma, Lina dan Afri), serta teman-teman yang lain (Vida, Rahma, Mala, Anti dan Upi), terima kasih kepada Mas Rijal teman seperjuangan yang selalu membantu dan selalu penulis repotkan dan teman-

teman Kimia 2010 yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu terima kasih atas bantuan dan kebersamaannya selama kuliah.

12. Teman-teman Kuliah Kerja Nyata Profesi (KKNP) angkatan ke-4, teman-teman keluarga besar IMPAR (aqmal, ika, mis, akbar, udin, dll) serta anak2 pondok BAIM (Ziah, Iis, Nurul Y, Nurul H, Ija, abang agus, Alya, dll) dan anak2 pondok ONEL (wulan, ratu, Tina, Fanti, Nur dll)

Dalam penulisan skripsi ini, penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan-kekurangan dan masih jauh dari kesempurnaan, maka penulis mengharapkan adanya kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak. Akhirnya, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca pada umumnya, Amin Ya Robbal 'alamiin.

Samata-Gowa, Desember 2014

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
**NURAINI**  
NIM:60500110028  
ALAUDDIN  
M A K A S S A R

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL.....</b>	<b>i</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vii-vi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xii</b>
 <b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	 <b>1-6</b>
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	5
C. Tujuan Penelitian .....	5
D. Manfaat Penelitian .....	6
 <b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	 <b>7-35</b>
A. Kanker .....	7
B. Tinjauan Umum Kayu Bitti ( <i>Vitex cofassus</i> ) .....	9
1. Deskripsi .....	9
2. Penyebaran dan Habitat .....	13
3. Pemanfaatan .....	13
C. Senyawa Metabolit Sekunder.....	15
D. Isolasi .....	18
1. Ekstraksi .....	18
2. Fraksinasi .....	20
a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	21
b. Kromatografi kolom.....	23
3. Pemurnian dan identifikasi.....	24
a. Kristalisasi dan Rekrystalisasi .....	24

b. Uji Pereaksi .....	26
c. Uji Spektroskopi Infra Red .....	27
E. Uji Toksisitas .....	29
1. Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BST) .....	29
2. Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach .....	30
F. Pelarut Organik .....	32
<b>BAB III. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>36-41</b>
A. Waktu dan Tempat .....	36
B. Alat dan Bahan .....	36
C. Prosedur Penelitian .....	37
1. Preparasi Sampel .....	37
2. Ekstraksi .....	37
3. Fraksinasi .....	37
4. Pemurnian .....	38
5. Identifikasi .....	38
6. Karakterisasi FTIR .....	40
7. Uji Toksisitas Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach .....	40
a. Penetasan larva udang <i>Artemia salina</i> Leach .....	40
b. Pembuatan Larutan sampel .....	40
c. Uji Toksisitas terhadap larva udang <i>Artemia salina</i> Leach dengan metode <i>BST</i> .....	41
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>42-56</b>
A. Hasil Pengamatan .....	42
B. Pembahasan .....	45
1. Ekstraksi .....	45
2. Fraksinasi .....	46
3. Pemurnian .....	49
4. Karakterisasi dengan FTIR .....	50
5. Uji toksisitas .....	51
<b>BAB V. PENUTUP .....</b>	<b>57</b>
A. Kesimpulan .....	57
B. Saran .....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b>	
<b>DAFTAR RIWAYAT HIDUP</b>	

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1. Daerah serapan inframerah untuk berbagai ikatan kimia .....	29
2.2. Urutan Tingkat Kepolaran Pelarut Organik.....	33
4.1. Hasil Uji Toksisitas .....	44
4.2. Hasil Uji Toksisitas .....	54



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Struktur (a) Stigmasterol dan (b) $\beta$ -sitosterol .....	10
2.2. Struktur dasar Flavonol.....	11
2.3. Gambar (a) Pohon Kayu Bitti ( <i>Vitex cofassus</i> ), (b) Kulit batang Kayu Bitti ( <i>Vitex cofassus</i> ) .....	12
2.4. Struktur Flavonoid .....	16
2.5. Struktur Alkaloid .....	18
2.6. Larva <i>Artemia salina</i> Leach.....	19
4.1.Kromatogram Hasil Uji tiga sistem eluen.....	21
4.2. Spektrum IR Kristal .....	44

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Diagram Alir Prosedur Kerja .....	63
Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian .....	64
Lampiran 3. Hasil Uji KLT ekstrak kental etanol Kulit batang kayu Bitti ( <i>Vitex cofassus</i> ).....	69
Lampiran 4. Kromatogram KLT 15 fraksi hasil Fraksinasi Awal .....	69
Lampiran 5. Kromatogram Hasil KLT satu noda Kristal .....	70
Lampiran 6. Kromatogram Kristal uji tiga sistem eluen .....	70
Lampiran 7. Tabel Hasil Uji Fitokimia Ekstrak kental, fraksi D dan Kristal	71
Lampiran 8. Gambar Uji Fitokimia Ekstrak kental, fraksi D dan kristal .....	72
Lampiran 9. Tabel hasil fraksi fraksinasi KKCV .....	72
Lampiran 10. Tabel hasil penggabungan fraksi KKCV .....	73
Lampiran 11. Perhitungan Konsentrasi Larutan uji toksisitas .....	73
Lampiran 12. Tabel Probit Untuk Uji Toksisitas .....	75
Lampiran 13. Tabel Uji Toksisitas Larva .....	76
Lampiran 14. Perhitungan persen (%) kematian larva .....	77
Lampiran 15. Perhitungan nilai $LC_{50}$ .....	83

## ABSTRAK

Nama : Nuraini

NIM : 60500110028

Judul : Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Antikanker dari Ekstrak  
Etanol Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*)

---

Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) merupakan salah satu tumbuhan yang termasuk dalam famili *Verbenaceae* dan dikenal oleh masyarakat Sulawesi Selatan sebagai bahan bangunan. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa bioaktif antikanker yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) dan untuk menentukan nilai bioaktivitas. Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi, fraksinasi, identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan uji fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder serta karakterisasi dengan FTIR. Hasil yang didapatkan dari isolasi adalah kristal yang berbentuk amorf dengan berat 0,0183 gram berwarna putih kekuningan. Pemurnian dilakukan menggunakan uji KLT tiga sistem eluen serta uji spektroskopi FTIR. Hasil menunjukkan bahwa kristal mengandung senyawa flavonoid yang diperkuat dengan uji fitokimia yang positif dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  5%, NaOH 10 % dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Ekstrak kental, fraksi dan kristal dilanjutkan uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach. Nilai  $\text{LC}_{50}$  yang didapatkan dari ketiga sampel adalah ekstrak kental 29,51 ppm, fraksi gabungan 169,82 ppm dan kristal 562,34 ppm.

Kata kunci: Kayu Bitti (*Vitex cofassus*), Isolasi, Senyawa Bioaktif, *Brine Shrimp Lethality Test* (BST),  $\text{LC}_{50}$ .



## ABSTRAC

Name : Nuraini  
NIM : 60500110028  
Title : Identification and characterization of anticancer bioactive compound from ethanol extract of vortex Bitti wood (*Vitex cofassus*)

---

Bitti wood (*Vitex cofassus*) is one of the plants in *Verbenaceae* family and known by the people of South Sulawesi as the building material. The aims of this research is to identify and characterize the anticancer bioactive compound in ethanol extract of vortex Bitti wood (*Vitex cofassus*) and to determine the bioactivity value. This research uses extraction method, fraction method, identification uses thin layer chromatography (TLC) and phytochemical test to know metabolism secunder and characterization with FTIR. The result from isolation shows that the cyrtal in amorf shape with 0,0183 gram has white and yellow colour. The purification is conduted by using TLC test of eluent three system and spectroscopy test FTIR. The result shows that the crystal has flavonoids compound which is solid with phytochemical test like positive product by using  $\text{FeCl}_3$  5%, NaOH 10% and  $\text{H}_2\text{SO}_4$ P. Thick extract, fraction combination and crystal continued with toxicity test with the animal test *Artemia salina* Leach it uses *Brine Shrimp Lethality test* (BST) method.  $\text{LC}_{50}$  value which is gotten the three samples is thick extract 29,51 ppm, combination fraction 169,82 ppm and crystal 562,34 ppm.

Keyword: Bitti wood (*Vitex cofassus*), isolation, bioactive compound, *Brine Shrimp Lethality Test* (BST),  $\text{LC}_{50}$ .

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### A. Latar Belakang

Indonesia termasuk salah satu Negara yang kaya akan keanekaragaman hayati. Keanekaragaman hayati yang terdapat di Indonesia terdiri dari  $\pm 30.000$  ribu jenis flora, terutama yang memiliki potensi sebagai obat alami. Dari spesies flora Indonesia ini, sekitar 1.260 spesies memiliki aktivitas farmakologi termasuk antikanker.<sup>1</sup> Keanekaragaman flora ini merupakan sumber bahan alam yang memberi potensi untuk ditemukannya sejumlah besar obat-obatan baru. Beberapa obat modern telah dikembangkan dari bahan alam yaitu pada tahun 2000-an sekitar 60% dari semua obat antikanker maupun antibakteri berasal dari bahan alam.<sup>2</sup> Keanekaragaman bahan alam merupakan sumber biomolekul senyawa-senyawa organik yang tidak terbatas jumlahnya.

Keanekaragaman hayati Indonesia terutama tersebar di setiap pulau besar seperti Kalimantan, Papua, Sulawesi, Jawa dan Sumatera. Keanekaragaman hayati diciptakan oleh Allah SWT untuk dapat dimanfaatkan oleh manusia. Hal tersebut merupakan rahmat yang diberikan oleh Allah SWT terhadap manusia sebagaimana dijelaskan dalam Alquran QS Thaha/20 : 53

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَّكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

---

<sup>1</sup>Chasanah U, *et.al.* "Anti Cancer Pre-Screening for Several Plant Using Brine Shrimp Lethality Test", *Jurnal Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang*. h. 1.

<sup>2</sup>Asriyani Ilyas, *Kimia Organik Bahan Alam* (Makassar: Alauddin University Press, 2013), h. 14.

*Terjemahnya:* “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam.”<sup>3</sup>

Ayat di atas menjelaskan tentang tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam yang merupakan bagian dari hidayah Allah kepada manusia dan makhluk hidup lainnya untuk memanfaatkan tumbuh-tumbuhan tersebut untuk kelangsungan hidup. Allah memberi hidayah kepada langit agar menurunkan air hujan dan hidayah buat hujan agar turun tercurah dan untuk tumbuh-tumbuhan agar tumbuh berkembang. Tumbuhan yang bermacam-macam bentuk dan rasa tersebut merupakan hal-hal yang menakjubkan dan membuktikan betapa agung ciptaan-Nya. Jenis-jenis tumbuhan contohnya tumbuhan yang berfungsi sebagai obat.<sup>4</sup>

Tumbuhan obat merupakan bagian dari sumber daya alam hayati yang dimanfaatkan oleh manusia. Tumbuhan obat menjadi salah satu alternatif obat yang dipilih oleh masyarakat luas. Hal ini karena tumbuhan obat tidak mempunyai efek samping yang besar apabila dibandingkan dengan obat modern yang terbuat dari bahan kimia sintesis. Obat herbal diperoleh dari tumbuh-tumbuhan baik berupa akar, kulit batang, kayu, daun bunga maupun biji. Agar pengobatan dapat dipertanggung jawabkan maka diperlukan penelitian ilmiah seperti identifikasi dan isolasi zat kimia aktif yang terdapat dalam tumbuhan.<sup>5</sup> Diantaranya berupa senyawa metabolit primer maupun metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, steroid dan flavonoid.

Senyawa-senyawa metabolit sekunder banyak digunakan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antipiritik serta antimikroba terutama untuk golongan senyawa fenolik,

---

<sup>3</sup> Al Quranul Karim, *Al Quran dan Terjemahnya* (Jakarta: Depertemen Agama RI, 1985).

<sup>4</sup> M. Quraish Shihab, *Tafsir Al Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al quran* (Jakarta: Lentera Hati, 2002), h. 317-318.

<sup>5</sup> Raina, *Tanaman Obat Untuk Kesehatan* (Yogyakarta: Absolut, 2011), h. 5.

flavonoid dan alkaloid. Senyawa-senyawa ini diketahui juga memiliki aktifitas yang dapat menghambat pertumbuhan dan membunuh sel kanker atau sebagai antikanker. Seperti yang kita ketahui bahwa setiap tahun peningkatan angka kejadian kanker semakin bertambah dan belum adanya terapi yang dianggap tepat untuk mengatasinya sehingga memicu masyarakat pada umumnya dan peneliti pada khususnya untuk mengeksplorasi bahan-bahan alam yang dianggap potensial sebagai alternatif agen antikanker.<sup>6</sup> Seperti yang dijelaskan dalam Al-qur'an QS Asy-syu'araa'/26:80-81 tentang penyakit yang dapat disembuhkan dengan izin Allah SWT.

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾ وَالَّذِي يُمِيتُنِي ثُمَّ يُحْيِينِ ﴿٨١﴾

Terjemahnya: Dan apabila Aku sakit, dialah yang menyembuhkan aku (80) Dan yang akan mematikan aku, Kemudian akan menghidupkan Aku kembali (81).”<sup>7</sup>

Senyawa-senyawa toksik yang dapat membunuh sel kanker tersebar di berbagai tumbuhan. Salah satu tumbuhan yang berpotensi adalah tumbuhan kayu Bitti (*Vitex cofassus*) yang merupakan tumbuhan endemik khas Sulawesi dan kayunya merupakan kayu unggulan Sulawesi Selatan. Penyebaran tumbuhan kayu Bitti (*Vitex cofassus*) di Sulawesi Selatan terdapat di beberapa Kabupaten yaitu Pangkep, Maros, Pinrang, Bantaeng, Enrekang, Bone, Bulukumba, Sidrap dan Selayar.<sup>8</sup> Publikasi penelitian dengan menggunakan Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) belum banyak dilaporkan. Masyarakat Sulawesi Selatan pada umumnya hanya

<sup>6</sup>Muthi Ikawati, *et.,al.* “Pemanfaatan Benalu Sebagai Agen Antikanker”, *Jurnal*. h. 1.

<sup>7</sup>Al Quranul Karim, *Al Quran dan Terjemahnya* (Jakarta: Depertemen Agama RI, 1985).

<sup>8</sup>Andriyani Prasetyawati, “Eksplorasi Benih Bitti (*Vitex Cofassus*) Di Sulawesi Selatan”, 2013.

memanfaatkan kayu Bitti (*Vitex cofassus*) sebagai bahan bangunan. Potensi lain yang dapat dikembangkan dalam pemanfaatan kayu Bitti (*Vitex cofassus*) adalah memanfaatkan sebagai tumbuhan yang memiliki efek toksik terhadap sel kanker dalam hal ini adalah batang kulitnya.

Tumbuhan lain yang memiliki genus yang sama dengan Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) adalah tumbuhan legundi (*Vitex trifolia*) yang telah banyak diteliti kandungan bioaktifnya dan memiliki beberapa efek farmakologi khususnya sebagai antikanker.<sup>9</sup> Salah satunya adalah penelitian yang dilakukan oleh (Hernández MM, *et.al*, 1999), ekstrak n-heksana dan diklorometana dari batang dan daun spesies *Vitex trifolia* (Legundi) terbukti sangat toksik terhadap beberapa sel kanker.<sup>10</sup> Kandungan senyawa bioaktifnya adalah jenis flavonoid yaitu jenis *persikogenin*, *artemetin*, *luteolin*, *penduletin*, *vitexicarpin* dan *chrysosplenol-D*. Keenam flavonoid tersebut mampu menghambat proliferasi sel kanker dengan mekanisme penghambatan siklus sel dan menginduksi apoptosis.<sup>11</sup>

Pengujian senyawa dari tumbuhan yang memiliki potensi bioaktivitas sebagai antikanker dapat dilakukan dengan pengujian toksisitasnya. Penelitian ini menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Metode ini merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tumbuhan. Hasil uji toksisitas dengan metode ini telah terbukti memiliki

---

<sup>9</sup>Agung Endro Nugroho dan Gemini Alam, “Review Tanaman Obat Legundi (*Vitex Trifolia* L.)

<sup>10</sup>Herna’ndez, M.M, *et.al*, “Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae), *J. of Ethnopharmacol* “ *Jurnal* (1999).

<sup>11</sup>Li, W.X, *et.al*, “Flavonoids from *Vitex trifolia* Inhibit Cell Cycle Progression at G2/M phase and Induce Apoptosis in Mammalian Cancer Cells”, *J Asian Nat* (2005). h. 615.

korelasi dengan daya sitotoksis senyawa antikanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan cukup akurat. Uji toksisitas merupakan skrining awal untuk pencarian obat antikanker.<sup>12</sup> Berdasarkan uraian di atas, maka perlu kiranya diadakan suatu penelitian yang mengkaji kandungan bioaktif ekstrak etanol kulit batang tumbuhan kayu Bitti (*Vitex cofassus*). Oleh karena itu peneliti mengangkat judul identifikasi dan karakterisasi senyawa bioaktif antikanker dari ekstrak etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*).

## **B. Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah jenis senyawa bioaktif antikanker yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*)?
2. Bagaimana pengaruh bioaktifitas senyawa antikanker dari ekstrak etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach?

## **C. Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa bioaktif antikanker yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*).
2. Untuk menentukan nilai bioaktifitas senyawa antikanker dari kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach.

---

<sup>12</sup> Ercila Risky Rolliana, "Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria alba* L.) terhadap Larva *Artemia Salina leach* dengan Metode Brine Shrimp Lethality test (BST) ", *Artikel Karya Tulis Ilmiah*. (2010)".

#### **D. Manfaat**

Manfaat dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai kandungan senyawa bioaktif antikanker pada kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*).
2. Memberikan sumbangan bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya kimia organik bahan alam.
3. Memberikan informasi dan pengetahuan baru bagi peneliti tentang manfaat dan kandungan senyawa bioaktif antikanker yang terdapat di dalam kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*).

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Kanker

Kanker masih menjadi penyakit yang paling berbahaya di dunia. Berdasarkan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) pada tahun 2005, sekitar 7,6 juta orang meninggal disebabkan oleh kanker. Di negara maju kanker adalah penyakit kedua yang menyebabkan kematian setelah penyakit kardiovaskuler. Sebagai negara berkembang penyakit kanker di Indonesia menjadi penyakit keenam dengan angka kematian yang tinggi. Dengan kata lain, Indonesia memiliki banyak potensi sumber daya alam, terutama keanekaragaman hayati yang memiliki banyak potensi sebagai obat alami.<sup>13</sup>

Beberapa tahun terakhir, pengembangan obat antikanker baru telah menjadi topik utama. Hal ini disebabkan karena sel-sel kanker yang resisten terhadap kemoterapi. Terapi kanker dengan obat-obatan herbal merupakan alternatif yang dipilih masyarakat karena toksisitas dan biayanya yang rendah. Terutama, obat antikanker klinis yang relevan seperti *Taxol*, *Camptothecin*, *vinblastin* dan *vincristin* baik phytochemical dikenal yang memiliki potensi sebagai antikanker. Berbagai macam bahan alami telah diakui memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis pada sel tumor pada manusia seperti bahan alami yang mengandung senyawa bioflavonoid. Bioflavonoid adalah salah satu senyawa yang dalam beberapa tahun terakhir memiliki potensi sebagai agen antikanker. Bioflavonoid berfungsi untuk

---

<sup>13</sup>Chasanah U, *et.al.* "Anti Cancer Pre-Screening for Several Plant Using Brine Shrimp Lethality Test", h. 1.



menginduksi apoptosis pada sel tumor yang dianggap sangat berguna dalam terapi serta pencegahan kanker.<sup>14</sup>

Kanker merupakan pertumbuhan abnormal dari sel-sel dalam tubuh yang dapat menyebabkan kematian. Sel-sel kanker biasanya menyerang dan menghancurkan sel-sel normal. Sel-sel ini muncul karena ketidakseimbangan fungsi-fungsi organ dalam tubuh. Setiap tahun, jutaan orang yang didiagnosis dengan kanker, menyebabkan kematian. Menurut American Cancer Society, kematian yang timbul dari kanker merupakan 2-3% dari kematian tahunan yang tercatat di seluruh dunia. Dengan demikian kanker membunuh sekitar 3500 juta orang setiap tahunnya di seluruh dunia. Beberapa agen pencegahan kemoterapi yang digunakan untuk mengobati kanker, memiliki banyak efek samping yang membatasi penggunaannya. Kerja kanker dalam tubuh dimulai dengan mutasi pada DNA, yang memerintahkan sel-sel untuk tumbuh dan membelah. Sel-sel normal memiliki kemampuan untuk memperbaiki sebagian besar mutasi pada DNA, tetapi mutasi yang tidak diperbaiki sehingga menyebabkan sel-sel untuk tumbuh menjadi kanker.<sup>15</sup>

Penyebab kanker dipengaruhi oleh banyak faktor seperti merokok/terkena paparan asap rokok, mengkonsumsi alkohol, paparan sinar ultraviolet pada kulit, obesitas, diet tidak sehat, kurang aktifitas fisik dan infeksi yang berhubungan dengan kanker. Kanker dapat dicegah dengan mengurangi faktor resiko terjadinya kanker tersebut. Dalam perkembangan di bidang kesehatan

---

<sup>14</sup>S. Kavitha Bagya, P.V. Rajashree dan Kishore Gnana Sam, "Preliminary Anticancer Screening and Standardization of some Indigenous Medicinal Plants using Cell-biology and Molecular Biotechnology Based Models"*Journal of Medicinal Plant*, 5: 728-737". (2011).

<sup>15</sup>National cancer Institute at the National Institutes of Health, "Cancer" (2014).

telah ditemukan obat-obat antikanker serta kemoterapi, namun faktor biaya yang mahal menjadi kendala. Hal ini mendorong masyarakat untuk melakukan pengobatan menggunakan bahan alam atau obat tradisional.<sup>16</sup> Obat tradisional atau obat-obatan alami telah dikenal oleh masyarakat Indonesia sejak zaman dahulu. Selain khasiatnya yang telah turun temurun digunakan oleh masyarakat, obat ini lebih murah dan mudah didapat, namun diperlukan penelitian yang lebih lanjut karena banyaknya tanaman yang belum diketahui kadar toksisitasnya. Salah satu tumbuhan yang dapat digali toksisitasnya sebagai antikanker adalah tumbuhan dari famili *Verbenaceae* genus *Vitex* dengan spesies *Vitex cofassus* (Kayu Bitti).

## **B. Tinjauan Umum Kayu Bitti (*Vitex cofassus*)**

### **1. Deskripsi**

Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) merupakan salah satu jenis tumbuhan yang termasuk dalam famili *Verbenaceae*. Menurut sistem klasifikasi suku tumbuhan, *Verbenaceae* termasuk dalam famili *Lamiales*. *Verbenaceae* merupakan tumbuhan semak yang berupa pohon dan memiliki ranting-ranting yang berbentuk segi empat dan memiliki bau yang harum.<sup>17</sup> Beberapa penelitian sebelumnya menjelaskan tentang manfaat dan kandungan senyawa metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dalam beberapa genus yang termasuk dalam famili *Verbenaceae* adalah Ekstrak etanol daun *Lantana camara* memiliki efek farmakologi yaitu memiliki daya

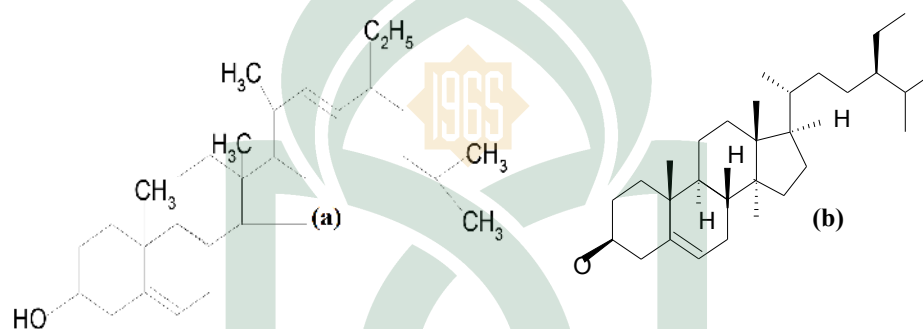
---

<sup>16</sup>Arter D. Muaja, Harry S. J. Koleangan dan Max R. J. Runtuwene, “Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. “*Jurnal MIPA Unsrat Online*2(2) 115-118”. (2013). h. 115.

<sup>17</sup> L. Watson dan MJ Dallwitz, “*Verbenaceae*”,

toksistas serta antitumor dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach.<sup>18</sup>

Famili yang sama dengan genus yang berbeda yaitu genus *Duranta* dengan spesies *Duranta repens* L bahwa ekstrak metanol dan fraksi kloroform buahnya mempunyai kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid jenis flavonol dan senyawa-senyawa kumarolignan, diterpenoid, stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol. Struktur dari stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol adalah sebagai berikut:



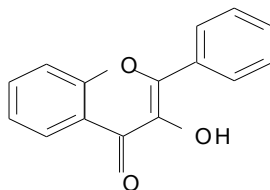
Gambar 2.1: Struktur (a) stigmasterol dan (b)  $\beta$ -sitosterol

Dari sekian senyawa yang diduga bertanggung jawab terhadap aktivitas antimalaria dan merupakan senyawa utama dalam buah *Duranta repens* L adalah flavonol.<sup>19</sup>

<sup>18</sup>Lilybeth F. Olowa dan Olga M. Nuñez, “ Brine Shrimp Lethality Assay of the Ethanolic Extracts of Three Selected Species of Medicinal Plants from Iligan City, Philippines “*International Research Journal of Biological Sciences* Vol. 2(11), 74-77, ISSN 2278-3202”. (2013). h. 74.

<sup>19</sup>Nuri, *et.al*, “Aktivitas Antimalaria Ekstrak Metanol Dan Fraksi Kloroform Buah *Duranta Repens* L. Pada Mencit Yang Diinfeksi *Plasmodium Berghei*” *Jurnal Sainstek*, vol. 8, no.1 (2009). h. 17.

Struktur dasar senyawa flavonol adalah sebagai berikut :



**Gambar 2.2 : Struktur Dasar Flavonol**

Penelitian tentang genus yang lain adalah genus *Vitex* dengan spesies *Vitex trifolia* (Legundi) yang diketahui banyak memiliki efek farmakologi yaitu sebagai antibakteri, antifungi, analgesik, antialergi, antipiretik dan salah satunya sebagai antikanker.<sup>20</sup> Spesies yang termasuk dalam genus yang sama yaitu *Vitex* masih banyak yang belum diteliti kandungan metabolit sekundernya salah satunya adalah *Vitex cofassus* (kayu Bitti).

Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) merupakan salah satu pohon endemik Sulawesi yang pada dasarnya adalah pohon khas provinsi Gorontalo. Kayu yang dihasilkan merupakan kayu unggulan Sulawesi Selatan. Dibeberapa daerah dikenal dengan nama gufasa. Di tingkat internasional, kayu Bitti (*Vitex cofassus*) banyak di ekspor dari Papua Nugini dan beberapa negara di kepulauan Pasifik lainnya.<sup>21</sup>

Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) mempunyai ukuran pohon yang sedang hingga besar. Batangnya mempunyai diameter yang dapat mencapai 30-170 sentimeter, kayunya padat dan berwarna keputihan. Kayunya sedang hingga berat serta kuat dan tahan lama. Struktur daun bersilangan dan memiliki susunan bunga terminal yang merupakan bunga berkelamin ganda. Mahkota bunga berwarna putih keunguan dan

<sup>20</sup>Agung Endro Nugroho dan Gemini Alam, “Review Tanaman Obat Legundi (*Vitex Trifolia* L.)”,

<sup>21</sup>Gusmiaty, Muh. Restu dan Ira Pongtuluran, “Seleksi Primer Untuk Analisis Keragaman Genetik Jenis Bitti (*Vitex cofassus*)”, *Jurnal Perennial* ISSN: 1412-7784. vol. 8 no. 1(2012), h. 25.

terdapat tangkai dan kepala sari di dalam rongga mahkota. Bakal buah berada di atas dasar bunga dan mempunyai buah yang berdaging yang berbentuk bulat hingga lonjong. Buahnya berwarna ungu tua dan terdapat 1 sampai 4 biji dalam setiap buahnya.<sup>22</sup>



Gambar 2.3: (a) Pohon Kayu Bitti (*Vitex cofassus*), (b) Kulit batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*)

Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) dapat diklasifikasikan sebagai berikut :<sup>23</sup>

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Class	: Angiospermae
Ordo	: Tubiflorae
Famili	: Verbenaceae
Genus	: Vitex
Spesies	: <i>Vitex Cofassus</i>

Di Pulau Sulawesi spesies kayu Bitti (*Vitex cofassus*) yang paling banyak ditemukan yaitu spesies *Vitex cofassus* Reinw, *Vitex celebica* dan *Vitex pubescens*.

<sup>22</sup>Anonim, “*Vitex cofassus* Reinw. ex Blume”,

<sup>23</sup>Anonim, “*Pohon Gofasa, Gupasa, atau Kayu Bitti (Vitex cofassus)*”

Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) memiliki nama tersendiri di masing-masing daerah. Di Jawa dikenal dengan nama Gandaria atau Jatake, suku Dayak mengenalnya dengan nama Barania sedangkan di Papua Nugini dan Kepulauan Solomon dikenal dengan nama New Guinea Teak atau Jati Nugini. Terkhusus di daerah Sulawesi Selatan dikenal dengan nama Kalawasa, Rappo-Rappo Kebo', Buwa Malawe, Katondeng dan Aju Bitti.<sup>24</sup>

## 2. *Penyebaran dan Habitat*

Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) tumbuh tersebar secara alami di Sulawesi selatan serta di Maluku, Papua Nugini, Kepulauan Bismarck dan Pulau Solomon. Habitat kayu Bitti (*Vitex cofassus*) adalah di hutan di dataran rendah sampai ketinggian 2000 meter dari permukaan laut namun pertumbuhannya lebih bagus jika ditanam di daerah di bawah ketinggian 800 meter. Kayu Bitti (*Vitex Cofassus*) memerlukan pencahayaan yang cukup dan tumbuh baik pada tanah berkapur dengan tekstur mulai lempung hingga pasir.<sup>25</sup>

## 3. *Pemanfaatan*

Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) telah dimanfaatkan oleh masyarakat Sulawesi Selatan sebagai bahan pembuat perahu pinisi. Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) juga banyak dimanfaatkan untuk kegunaan lain seperti kayu bangunan seperti tiang, kusen, pintu, jendela, atap, lantai dan dinding serta perabot rumah tangga seperti mangkok dan piring. Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) dipilih karena memiliki tekstur yang baik dan tahan terhadap rayap.<sup>26</sup> Pemanfaatan kulit kayu Bitti (*Vitex cofassus*) sebagai obat

<sup>24</sup>Anonim, "Sekilas Tentang Kayu Bitti (*Vitex Cofassus*) atau New Guinea Teak"

<sup>25</sup>Anonim. "Pohon Gofasa, Gupasa, atau Kayu Biti (*Vitex cofassus*)".

<sup>26</sup>Anonim, "Pohon Gofasa, Gupasa, atau Kayu Biti (*Vitex cofassus*)".

merupakan salah satu alternatif untuk pencarian obat baru. Kulit batang merupakan bagian batang atau kulit yang banyak digunakan sebagai obat. Kulit batang umumnya diambil dari bagian kulit terluar tanaman tingkat tinggi yang berkayu. Bagian yang sering digunakan sebagai bahan ramuan obat meliputi kulit akar sampai ke lapisan epidermis. Biasanya bahan obat untuk kulit batang dapat diperoleh dari bagian batang tumbuhan tahunan atau tumbuhan semusim.

Beberapa penelitian sebelumnya yang memanfaatkan kulit batang tumbuhan sebagai obat adalah ekstrak etanol kulit batang *Streblus asper*. Lour yang memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, glikosida dan sterol. Ekstrak kulit batang yang diperoleh memiliki aktifitas antikarsinogen yaitu sebagai antimitotik, sitotoksik dan memiliki aktifitas antitumor.<sup>27</sup>

Tumbuhan yang berfungsi sebagai obat banyak memiliki manfaat untuk manusia. Sebagaimana yang dijelaskan dalam sebuah hadits adalah dari Jabir berkata,

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أَصَابَ الدَّوَاءُ الدَّاءَ، بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
ALAUDDIN  
MARSAKAR

Terjemahnya: “Rasulullah bersabda, bagi tiap-tiap penyakit itu ada obatnya, apa bila obat yang dengan penyakitnya maka ia sembuh dengan izin Allah.” (H.R. Muslim). Hadits di atas memberikan gambaran bahwa setiap penyakit yang diturunkan Allah kepada hamba\_Nya ada obatnya. Tugas manusia hanya bagaimana cara menemukan obat tersebut. Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) merupakan salah tumbuhan yang berpotensi yang dapat dijadikan sebagai obat untuk mengobati penyakit khususnya kanker.

---

<sup>27</sup> Anm Alamgir, Minhajur Rahman dan Ataur Rahman, “ Phytochemical characteristics, antimitotic, cytotoxic and antitumor activities of bark extract *Streblus asper*. Lour “*Bangladesh J. Bot.* 42(1): 17-2”. (2013). h. 17.

Seperti yang dijelaskan dalam QS Ali-Imran/2:191 bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT dimuka bumi ini tidak ada yang sia-sia yaitu seperti kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*).

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ  
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Terjemahnya:”(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan Ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, Maka peliharalah kami dari siksa neraka.”<sup>28</sup>

### C. Senyawa Metabolit sekunder

Berbagai jenis tumbuhan seperti kayu Bitti (*Vitex cofassus*) merupakan sumber daya hayati dan sekaligus sebagai gudang senyawa kimia baik berupa senyawa kimia hasil metabolisme primer yang disebut juga sebagai senyawa metabolit primer seperti protein, karbohidrat dan lemak yang digunakan sendiri oleh tumbuhan tersebut untuk pertumbuhannya maupun sebagai sumber senyawa metabolit sekunder.<sup>29</sup>

Metabolit sekunder merupakan molekul organik yang tidak terlibat secara langsung dalam pertumbuhan dan perkembangan normal dari suatu organisme. Metabolit sekunder ditandai oleh keragaman kimia yang sangat besar dimana setiap organisme memiliki karakteristik tersendiri dalam setiap kandungan senyawa metabolit sekundernya. Metabolit sekunder berperan dalam hubungan organisme

<sup>28</sup>Al Quranul Karim, *Al Quran dan Terjemahnya* (Jakarta: Depertemen Agama RI, 1985).

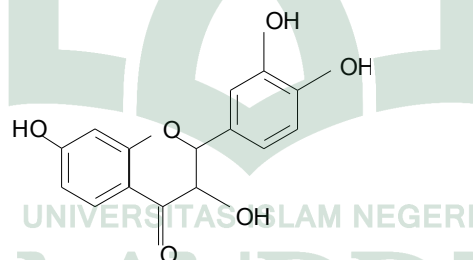
<sup>29</sup>Sovia Lenny, “Senyawa Terpenoida dan Steroida”, *Karya Ilmiah*. (2006). h. 6



dengan lingkungannya, seperti perlawanan terhadap hama dan penyakit, sebagai pengontrol penyerbuk. Senyawa metabolit sekunder sangat beragam yang disintesis oleh tumbuhan, hewan, jamur, bakteri serta alga.<sup>30</sup>

Senyawa-senyawa kimia yang merupakan hasil metabolisme sekunder pada tumbuhan sangat beragam. Menurut penelitian yang telah dilakukan adalah ekstrak kulit batang kayu bitti (*Vitex cofassus*) mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid dan alkaloid.

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar. Kira-kira 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuhan diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berkaitan erat dengannya. Senyawa flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga, buah dan biji.<sup>31</sup> Struktur senyawa flavonoid adalah sebagai berikut:



**Gambar 2.4: Struktur Flavonoid**

Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik yang memiliki banyak gugus OH dengan adanya perbedaan keelektronegatifan yang tinggi sehingga sifatnya polar. Golongan senyawa ini mudah terekstrak dalam pelarut polar seperti etanol yang memiliki sifat polar karena adanya gugus hidroksil sehingga dapat terbentuk

<sup>30</sup>Asriyani Ilyas, *Kimia Organik Bahan Alam*, h. 4-5.

<sup>31</sup>Julianti eva, *et.,al*, "Isolasi Senyawa Flavonoida dari Daun Tumbuhan Jati Putih (*Gmelina arborea* Roxb.)", *Jurnal Sainia Kimia*. vol. 1 no. 1 (2012), h. 29.

ikatan hidrogen.<sup>32</sup> Beberapa penelitian yang menjelaskan tentang senyawa flavonoid yang terdapat dalam kulit batang tumbuhan salah satunya adalah kulit batang *Ziziphus mauritiana*. Lam yang diekstrak mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder antara lain flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin. Flavonoid merupakan senyawa penting yang berfungsi untuk mencegah kerusakan sel oksidatif yang bersifat sebagai antikanker dan melawan semua yang bersifat karsinogen. Flavonoid juga dapat berfungsi untuk mengurangi resiko penyakit jantung.<sup>33</sup>

Selain senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai antikanker, senyawa metabolit sekunder lainnya yang berpotensi adalah alkaloid. Alkaloid merupakan senyawa yang termasuk dalam metabolit sekunder yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen (N). Alkaloid seringkali bersifat beracun bagi manusia dan mempunyai fungsi fisiologis yang digunakan sebagai obat.<sup>34</sup>

Alkaloid mengandung nitrogen sebagai bagian dari sistem sikliknya serta mengandung substituen yang bervariasi seperti gugus amina, amida, fenol dan metoksi sehingga alkaloid bersifat semipolar. Pada pengujian alkaloid akan terjadi reaksi pengendapan karena adanya penggantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid mengganti ion iod dalam pereaksi dragendroff dan pereaksi mayer. Hal ini mengakibatkan terbentuknya endapan jingga pada penambahan pereaksi dragendroff karena nitrogen

---

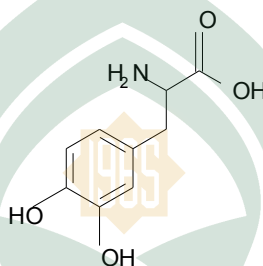
<sup>32</sup>Elok Kamilah Hayati dan Nurhalimah, "Pytochemical Test and Brine Shrimp Lethality Test Against *Artemia salina* Leach of Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) Plant Extract " *Alchemy*. Vol. 1, no.2 (2010), h. 79.

<sup>33</sup>Shashank Bhatt dan Suresh Dhyani, " Quantification of Secondary Metabolites from *Ziziphus mauritiana* Lam. Bark " *International Journal of Bio-Technology and Research (IJBTR) ISSN 2249-6858 Vol. 3, Issue 2* ". (2013). h. 1.

<sup>34</sup>J.B. Harbone, *Phytochemical Methods*, terj. Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. *Metode Fitokimia*, h. 234-235.

digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan  $K^+$  yang merupakan ion logam dan terbentuk endapan putih kekuningan pada penambahan pereaksi Mayer karena nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomercurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap.<sup>35</sup>

Struktur dasar senyawa alkaloid adalah sebagai berikut:



**Gambar 2.5: Struktur Alkaloid**

Alkaloid untuk keperluan obat-obatan alkaloid diisolasi dari akar, daun buah, biji dan kulit batang tumbuhan.<sup>36</sup> Ekstrak dari tanaman *Tabernaemontana catharinensis* mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid jenis koronaridin dan voacangin yang memiliki aktifitas sebagai antikanker.<sup>37</sup>

#### **D. Isolasi**

Isolasi adalah teknik pemisahan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu bahan alam baik yang berasal dari tumbuhan, hewan maupun

<sup>35</sup>Dewi, Astuti dan Warditiani, "Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). "Jurnal", h. 15".

<sup>36</sup>Midian Sirait, *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi* (Bandung: ITB, 2007), h. 55-56.

<sup>37</sup>Pereira, Carvalho dan Meireles, "Anticancer Activity of *Tabernaemontana catharinensis* extract Obtained by supercritical Fluid Extraction", *Rev. Bras.Pl. Med., Botucatu Brasil*, v.8, n.4. (2006), h. 144.

mikroorganisme. Isolasi senyawa bahan alam terdiri dari beberapa tahap mulai dari ekstraksi, fraksinasi, pemurnian, identifikasi serta karakterisasi.<sup>38</sup>

### 1. *Ekstraksi*

Ekstraksi adalah pemisahan secara kimia atau fisika sejumlah bahan padat atau bahan cair yang terdapat pada jaringan tumbuhan. Ekstraksi berlangsung dalam dua proses yaitu pelepasan bahan yang diekstraksi melalui proses dari sel tumbuhan yang telah rusak dan pelepasan bahan yang diekstraksi melalui proses difusi. Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan pada proses kesetimbangan. Konsentrasi kesetimbangan akan berakhir apabila distribusi zat aktif yang diekstraksi telah mencapai kesetimbangan konstan dan tidak berubah lagi diantara pelarut dan residu.<sup>39</sup>

Ekstraksi bahan aktif dari jaringan tumbuhan mempunyai prinsip pelarut harus berdifusi ke dalam sel dan selanjutnya zat aktif harus cukup larut di dalam pelarut. Dengan demikian akan dicapai kesetimbangan antara pelarut dan zat terlarut. Kecepatan untuk mencapai kesetimbangan bergantung pada temperatur, pH dan ukuran partikel dengan gerakan pelarut di sekitar partikel. Derajat keasaman atau kebasaaan biasanya berperan dalam hal selektifitas sedangkan temperatur dan gerakan cairan disekitar padatan akan mengubah kesetimbangan menjadi saturasi pelarut.<sup>40</sup>

Ekstraksi zat aktif yang berasal dari jaringan tumbuhan untuk mencapai kesempurnaan harus memilih pelarut yang ideal yaitu pelarut yang menunjukkan selektivitas maksimal, mempunyai kapasitas terbaik yang ditinjau dari koefisien saturasi bahan dan kompatibel dengan sifat-sifat bahan yang diekstraksi. Pada

---

<sup>38</sup> Asriyani Ilyas, *Kimia Organik Bahan Alam*, h. 2.

<sup>39</sup> Goeswin Agus, *Teknologi Bahan Alam* (Bandung: ITB, 2007), h. 32.

<sup>40</sup> Goeswin Agus, *Teknologi Bahan Alam*, h. 33.

umumnya bahwa pelarut yang termasuk dalam alkohol alifatik sampai dengan tiga atom karbon atau campurannya dengan air merupakan pelarut dengan daya ekstraktif yang sangat besar atau tertinggi untuk semua bahan alam yang berbobot molekul rendah seperti flavonoid, saponin dan alkaloid. Menurut farmakope, etanol merupakan pelarut pilihan untuk memperoleh ekstrak secara klasik seperti ekstrak cair, kental dan kering yang masih digunakan dalam isolasi senyawa obat dalam jaringan tumbuhan. Syarat-syarat pelarut di samping mempunyai daya ekstraktif yang tinggi, paling sedikit harus bersifat selektif dan dapat digunakan tidak hanya untuk mendapatkan ekstrak tetapi dapat pula digunakan untuk ekstraksi jaringan tumbuhan yang bahan aktifnya belum diketahui.<sup>41</sup>

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi dengan cara maserasi. Maserasi adalah proses penyarian jaringan tumbuhan menggunakan pelarut dengan beberapa kali perendaman pada temperatur kamar. Perendaman diakhiri setelah pelarut tidak berwarna. Proses maserasi memiliki keuntungan dalam proses isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut.<sup>42</sup>

---

<sup>41</sup> Goeswin Agus, *Teknologi Bahan Alam*, h. 34.

<sup>42</sup> Wardah, "Isolasi, Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Fraksi Etil Asetat pada Ekstrak Tanaman *Acalypha indica* Linn.", (*Skripsi Sarjana*, Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Depok, Depok, 2012), h. 10-11.

## 2. *Fraksinasi*

Fraksinasi adalah proses pemisahan komponen-komponen senyawa dalam ekstrak menjadi fraksi. Pemisahan kandungan tumbuhan dapat dilakukan dengan metode pemisahan yaitu kromatografi baik kromatografi lapis tipis maupun kromatografi kolom.<sup>43</sup>

### a. *Kromatografi Lapis Tipis (KLT)*

Kromatografi lapis tipis adalah suatu teknik pemisahan komponen-komponen campuran senyawa-senyawa yang melibatkan partisi suatu senyawa di antara padatan penyerap (adsorben) sebagai fasa diam dengan suatu pelarut (fasa gerak) yang mengalir melewati adsorben (padatan penyerap). Pengaliran pelarut dikenal sebagai proses pengembangan oleh pelarut (elusi). Karena kesederhanaan dan kecepatan analisisnya. KLT mempunyai peranan penting dalam pemisahan senyawa-senyawa yang volatilitasnya relatif rendah, baik senyawa organik maupun senyawa anorganik.<sup>44</sup>

Analisis dengan KLT menggunakan contoh dalam jumlah yang sangat kecil yang ditempatkan sebagai titik noda di atas permukaan pelat tipis fasa diam (adsorben). Adsorben yang paling sering digunakan untuk KLT adalah alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) dan silika gel ( $\text{SiO}_2$ ). Pelat diletakkan dengan tegak dalam bejana pengembang (chamber) yang berisi sedikit pelarut pengembang. Kecepatan elusi senyawa-senyawa sebagai komponen-komponen contoh lebih cepat

---

<sup>43</sup> J.B. Harbone, *Phytochemical Methods*, terj. Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. *Metode Fitokimia*, h. 8-9.

<sup>44</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah Penulisan Buku Ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik* (Makassar: Unhas, 2011), h. 73.

dibandingkan dengan kecepatan pelarut yang mendahuluinya. Harga perbandingan ini dikenal sebagai harga  $R_f$  dan didefinisikan sebagai:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh noda}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Nilai  $R_f$  sangat berpengaruh pada adsorbent, pelarut, ketebalan lapisan, temperatur serta kelembaban.<sup>45</sup>

Sifat-sifat pelarut pengembang merupakan faktor dominan dalam menentukan mobilitas komponen-komponen campuran. Jika pelarut lebih polar daripada suatu komponen campuran maka molekul-molekul pelarut akan menggantikan molekul-molekul komponen pada padatan adsorben dan nilai  $R_f$ nya tinggi. Sebaliknya apabila pelarut kurang polar daripada suatu komponen campuran, komponen akan tetap pada adsorbent dan tidak digerakkan oleh pelarut ( $R_f=0$ ). Umumnya kemampuan suatu pelarut pengembang untuk menggerakkan senyawa pada suatu adsorbent berhubungan dengan tingkat kepolaran pelarut. Kemampuan ini disebut kekuatan elusi, dan urutan kekuatan elusi.<sup>46</sup>

Jika senyawa yang dianalisis dengan KLT adalah senyawa yang tidak berwarna, maka diperlukan suatu prosedur untuk mendeteksi noda yang diamati. Senyawa-senyawa yang dapat menyerap sinar (fluoresence) dapat ditampakkan melalui penyinaran pelat dengan sinar ultraviolet (lampu ultraviolet) di dalam tempat yang gelap. Jika padatan penyerap pada pelarut KLT telah mengandung indikator fluoresen, maka seluruh pelat akan menjadi terang bila disinari

---

<sup>45</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 74.

<sup>46</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 75.

dengan lampu ultraviolet kecuali daerah di mana senyawa berada. Keberadaan senyawa ditandai dengan noda hitam pada saat penyinaran. Metode lain yang umum digunakan untuk menampakkan senyawa-senyawa organik adalah menggunakan cairan penyemprot penampak noda misalnya asam sulfat.<sup>47</sup>

### **b. Kromatografi Kolom**

Kromatografi kolom adalah suatu bentuk kromatografi serapan (adsorpsi). Kromatografi kolom juga disebut kromatografi elusi karena senyawa-senyawa yang terpisah dielusikan dari dalam kolom. Prinsip kromatografi kolom sama dengan prinsip KLT, yakni senyawa-senyawa dalam campuran terpisahkan oleh partisi antara padatan penyerap sebagai fasa diam dan pelarut sebagai fasa bergerak yang mengalir melewati padatan penyerap.<sup>48</sup>

#### **1) Kromatografi Kolom Vakum**

Prinsip dasar kromatografi kolom vakum adalah pemisahan secara adsorpsi dan partisi yang dipercepat dengan bantuan pompa vakum. Keuntungan kromatografi kolom vakum dibandingkan dengan kromatografi konvensional terletak pada jumlah fase gerak yang digunakan. Kekurangan metode ini adalah membutuhkan waktu yang cukup lama. Kolom yang berupa corong *sintered glass* dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kemasan rapat yang maksimal. Pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penyerap lalu divakum kembali sampai pelarut yang memiliki tingkat kepolaran tinggi.<sup>49</sup>

---

<sup>47</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 77.

<sup>48</sup> Hardjono Sastrohamidjojo, *Kromatografi* (Yogyakarta : Liberty, 2007), h. 19 .

<sup>49</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 83.



## **2) Kromatografi Kolom Gravitasi**

Kromatografi kolom gravitasi termasuk jenis teknik kromatografi yang paling awal dikembangkan dan termasuk kromatografi serapan yang sering disebut kromatografi elusi. Dalam kromatografi kolom gravitasi, penyerap dikemas dalam kolom gelas dan pelarut mengalir melewati partikel-partikel penyerap. Karena kolom gelas dapat menampung lebih banyak penyerap maka dibandingkan dengan KLT, kromatografi kolom dapat digunakan untuk memisahkan komponen sampel dalam jumlah yang lebih banyak, biasanya dalam skala gram. Pemilihan sistem pelarut untuk pemisahan suatu campuran dengan kromatografi kolom didasarkan atas pemisahan campuran dengan KLT. Kromatografi kolom umumnya memberikan pemisahan yang rendah daripada yang dilakukan dengan KLT. Karena perbedaan kepolaran maka komponen-komponen sampel melewati kolom dengan kecepatan yang berbeda-beda, sehingga komponen-komponen terkumpul pada fraksi eluat yang berbeda. Fraksi yang dihasilkan dianalisis dengan KLT untuk menentukan komposisi senyawa dalam fraksi. Selanjutnya fraksi yang mengandung komponen murni yang sama digabung dan komponen tersebut telah terisolasi menjadi satu senyawa.<sup>50</sup>

## **3. Pemurnian dan Identifikasi**

Teknik yang paling sederhana dan efektif untuk pemurnian padatan senyawa organik adalah kristalisasi dan rekristalisasi. Serta proses identifikasi dengan menggunakan metode uji warna (uji pereaksi) dengan menggunakan pereaksi yang

---

<sup>50</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 86.

akan memberikan warna khusus serta uji spektroskopi salah satunya dengan menggunakan spektroskopi infrared (IR).

#### **a. Kristalisasi dan Rekristalisasi**

Senyawa yang berbentuk kristal kemurniannya mudah diketahui. Teknik rekristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai. Pada proses kristalisasi terjadi kesetimbangan antara molekul dalam larutan dan dalam kesetimbangan dengan kisi-kisi kristalnya. Karena kisi-kisi kristal lebih teratur, berbeda dengan molekul pengotor. Molekul pengotor akan dikeluarkan dari kisi-kisi kristal dan kembali ke larutan. Dengan demikian hanya molekul senyawa-senyawa yang diinginkan tetap dalam kisi-kisi kristal sedangkan pengotornya akan kembali ke larutan.<sup>51</sup>

Masalah utama dalam kristalisasi adalah pemilihan pelarut yang sesuai untuk melarutkan zat-zat pengotor. Pelarut ideal untuk kristalisasi adalah tidak bereaksi dengan senyawa yang akan dikristalkan, bersifat volatil sehingga mudah dipindahkan dari kristal, mempunyai titik didih yang lebih rendah daripada titik leleh senyawa yang dikristalkan, tidak beracun dan tidak mudah terbakar. Apabila senyawa yang akan dikristalkan telah diketahui, maka pelarut yang dapat digunakan dengan cepat dapat diketahui dari literatur yang ada. Hal yang berbeda jika senyawa yang akan dikristalkan belum diketahui, pelarut yang dapat digunakan harus ditentukan sendiri dan harus menggunakan prinsip *like dissolves like*. Misalnya kristalisasi senyawa nonpolar seperti hidrokarbon, digunakan pelarut nonpolar seperti heksana atau petroleum eter. Senyawa yang mengandung gugus polar seperti OH, paling baik dikristalkan dari pelarut polar yang mengandung

---

<sup>51</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 53.

OH seperti etanol. Kemurnian kristal ditandai dengan terbentuknya noda tunggal dalam beberapa sistem KLT.<sup>52</sup>

### **b. Uji Pereaksi**

Pendekatan skrining fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan yang meliputi akar, batang, daun, buah, bunga dan biji, terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif, yaitu alkaloid, antrakuinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin (steroid dan triterpenoid), tanin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid) dan sebagainya. Adapun tujuan pendekatan skrining fitokimia adalah mengetahui kandungan bioaktif atau kandungan yang berguna untuk pengobatan dalam tumbuhan.<sup>53</sup>

Uji alkaloid menurut Douglas *et.al*, pereaksi khusus yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid adalah pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff. Apabila terbentuk endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid, dengan pereaksi Mayer memberikan endapan putih, pereaksi Wagner memberikan endapan berwarna coklat dan pereaksi Dragendorff memberikan endapan berwarna jingga.<sup>54</sup>

Uji triterpenoid dan steroid dilakukan menurut Briggs, menggunakan pereaksi Lieberman Burchard. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah, jingga atau ungu sedangkan steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna

---

<sup>52</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 23.

<sup>53</sup> Dyah Septyaningsih, "Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.)" *Skripsi* (2010). h. 10.

<sup>54</sup> Mira Marlinda, Meiske S. Sangi dan Audy D. Wuntu. " Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.)" *Jurnal MIPA Unsrat Online*. (2012). h. 26.

biru. Uji tanin dilakukan menurut Miranda, menggunakan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau. Uji flavonoid dilakukan menurut Cai, menggunakan asam klorida yang ditambahkan dengan bubuk magnesium. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua serta menggunakan asam sulfat dan natrium hidroksida. Perubahan warna dengan asam sulfat adalah dari kuning tua sampai merah tua sedangkan untuk natrium hidroksida perubahan warna dari kuning muda sampai kuning tua.<sup>55</sup>

### c. Uji Spektroskopi Infra Red

Identifikasi suatu kandungan tumbuhan, setelah dilakukan isolasi dan dimurnikan. Identifikasi lengkap dalam golongan senyawa bergantung pada pengukuran sifat atau ciri lain yang kemudian dibandingkan dengan data dalam teori. Biasanya senyawa yang pernah diketahui dapat diidentifikasi berdasarkan data spektrum.<sup>56</sup>

Salah satu pengukuran spektroskopi yang digunakan adalah spektroskopi inframerah (IR). Spektroskopi inframerah (IR) digunakan untuk mengetahui jenis gugus fungsi dalam suatu jaringan tumbuhan yang diisolasi. Spektrum inframerah (IR) senyawa tumbuhan dapat diukur dengan spektrofotometri inframerah yang merekam secara otomatis dalam bentuk larutan. Daerah pada spektrum inframerah (IR) di atas  $1200 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan pita spektrum atau puncak yang disebabkan oleh getaran ikatan kimia atau gugus fungsi dalam molekul. Daerah di bawah  $1200 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan pita yang disebabkan oleh getaran seluruh molekul yang dikenal sebagai

<sup>55</sup>Mira Marlinda, Meiske S. Sangi dan Audy D. Wuntu. “ Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.)”, h. 27.

<sup>56</sup>J.B Harbone, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan Terbitan Kedua*, h. 20.

daerah sidik jari pada pita yang kuat, menengah dan lemah. Daerah sidik jari alkaloid pada cuplikan jaringan tumbuhan tidak ada. Spektroskopi inframerah dapat juga memberi sumbangan yang berguna bagi penentuan struktur apabila dijumpai senyawa baru dalam tumbuhan.<sup>57</sup>

Spektrum inframerah suatu molekul adalah hasil transisi antara tingkat energi getaran (vibrasi) yang berlainan. Inti-inti atom yang terikat oleh ikatan mengalami getaran (vibrasi) atau osilasi (oscillation). Apabila molekul menyerap radiasi inframerah, energi yang diserap menyebabkan kenaikan amplitudo getaran atom-atom yang terikat. Panjang gelombang dari absorpsi oleh suatu tipe ikatan, bergantung pada macam getaran dari ikatan tersebut. Oleh karena itu tipe ikatan yang berlainan seperti C-H, C-C, C=O, C=C, O-H dan sebagainya dapat menyerap radiasi inframerah pada panjang gelombang yang berlainan sehingga spektrometri inframerah dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya gugus fungsi dalam suatu molekul. Banyaknya energi yang diserap juga bervariasi dari ikatan ke ikatan. Yang disebabkan oleh perubahan dalam momen dipol ( $\mu \neq 0$ ) pada saat energi diserap. Ikatan nonpolar seperti C-H atau C-C menyebabkan penyerapan semakin lemah sedangkan ikatan polar seperti O-H, N-H dan C=O menunjukkan absorpsi yang paling kuat. Suatu ikatan dalam sebuah molekul dapat mengalami dua vibrasi yaitu stretching (ulur) yang berarti vibrasi sepanjang ikatan sehingga terjadi perpanjangan atau pemendekan ikatan dan vibrasi bending (tekuk) yang berarti vibrasi yang

---

<sup>57</sup>J.B. Harbone, *Phytochemical Methods*, terj. Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. *Metode Fitokimia*, h. 26.

disebabkan oleh sudut ikatan sehingga terjadi pembesaran atau pengecilan sudut ikatan.<sup>58</sup>

Beberapa ikatan kimia dapat menyerap daerah serapan inframerah dengan panjang gelombang yang berbeda-beda yang dapat dilihat dalam tabel berikut ini.<sup>59</sup>

**Tabel 2.1: Daerah Serapan Inframerah untuk Berbagai Ikatan Kimia**

No.	Tipe ikatan	Daerah Serapan ( $\text{cm}^{-1}$ )
1.	C-C, C-O dan C-N	1300-800
2.	C=C, C=O, C=N dan N=O	1900-1500
3.	C $\equiv$ C dan C $\equiv$ N	2300-2000
4.	C-H, O-H dan N-H	2700-3800

## E. Uji Toksisitas

### 1. Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)

Tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat perlu dilakukan uji khasiat terhadap bahan aktifnya. Salah satu metode yang digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) yang merupakan skrining awal bahan aktif dari suatu ekstrak tumbuhan. *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) adalah suatu *bioassay* untuk mendeteksi bioaktivitas dari suatu tumbuhan. *Bioassay* dianggap sebagai metode yang berguna untuk tahap awal dalam mengetahui tingkat toksisitas ekstrak tumbuhan dalam

<sup>58</sup> Unang Supratman, *Elusidasi Struktur Senyawa Organik Metode Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik* (Bandung: Widya Padjajaran, 2010), h. 66.

<sup>59</sup> Unang Supratman, *Elusidasi Struktur Senyawa Organik Metode Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*, h. 72.

mendeteksi racun jamur, toksisitas ekstrak tumbuhan serta toksisitas logam berat.<sup>60</sup> *Bioassay* ini mudah dilakukan, murah dan hanya memerlukan sedikit bahan uji. Metode ini merupakan skrining awal yang dapat disempurnakan oleh *bioassay* lainnya yang lebih spesifik dan lebih mahal setelah senyawa aktif dari suatu bahan uji dapat dipisahkan seperti Lemna Minor Bioassay, Crown-Gall Potato Disc Bioassay serta Pengujian pada sel telur babi. Metode ini diperkenalkan oleh Meyer tahun 1982, uji letalitas ini telah berhasil dipakai sebagai *bioassay-guide* untuk fraksinasi agen-agen sitotoksik dan antitumor.<sup>61</sup>

Senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan hampir selalu toksik pada dosis tinggi, oleh karena itu daya bunuh senyawa aktif terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk membuktikan ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas dan juga memonitor fraksi bioaktif selama fraksinasi dan pemurnian. Salah satu organisme yang sesuai untuk hewan uji adalah *Artemia* (udang laut) jenis *Artemia salina*.<sup>62</sup>

## 2. Larva Udang *Artemia salina* Leach

*Artemia* yang termasuk dalam spesies *Artemia salina* Leach adalah udang yang termasuk dalam famili *Artemidae* yang merupakan udang-udangan tingkat rendah yang hidup sebagai zooplankton yang menempati perairan-perairan yang memiliki kadar garam tinggi. *Artemia* dapat digunakan di Laboratorium *bioassay*

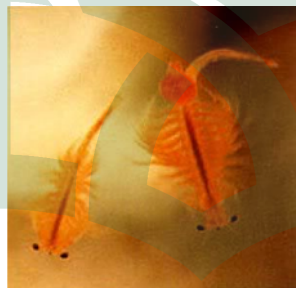
---

<sup>60</sup>Alluri V. Krishnaraju, *et.al*, "Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay" *International Journal of Applied Science and Engineerin*, 2005, h. 126.

<sup>61</sup>Arya Srisadono, "Skrining Awal Ekstrak Etanol Daun Sirih (*piper betle* linn) Sebagai Antikanker dengan Metode Brine Shrimp Lethality Tes (BSLT)", *Artikel Karya Tulis Ilmiah*. (2008).

<sup>62</sup>Shinta Suhirman, *et.al*, "Uji Toksisitas Ekstrak Lempuyung Gajah (*Zingiber zerumbet*) terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach)", *Bul. Littro*, vol. XVII, no. 1, h. 31.

untuk menentukan toksisitas dengan perhitungan konsentrasi yang menimbulkan 50% kematian ( $LC_{50}$ ) yang telah dilaporkan untuk racun dari ekstrak tanaman atau tumbuhan. Istilah untuk telur artemia adalah *siste* yaitu telur yang telah berkembang menjadi embrio dan kemudian diselubungi oleh cangkang yang tebal dan kuat. Cangkang berguna untuk melindungi embrio terhadap pengaruh kekeringan, sinar ultraviolet dan mempermudah pengapungan. Artemia yang direndam dalam air laut bersuhu 25°C maka akan menetas dalam waktu 24-36 jam menjadi larva (naupli). Artemia dapat tumbuh dengan baik pada suhu antara 25°C-30°C dengan kadar garam yang tinggi dengan pH=8. Larva yang telah menetas memiliki warna merah, yang dapat dilihat pada gambar berikut ini.<sup>63</sup>



**Gambar 2.6: Larva *Artemia salina* Leach**

*Artemia salina* Leach secara luas telah digunakan untuk pengujian aktivitas farmakologis ekstrak suatu tanaman atau tumbuhan. Artemia juga merupakan hewan uji yang digunakan untuk praskrining aktivitas antikanker di *National Cancer Institute* (NCI) Amerika Serikat. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan hewan uji *Artemia salina* Leach dapat digunakan untuk skrining awal terhadap

---

<sup>63</sup>Ridho Bertomi Panjaitan , “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiae cortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)”, (*Skripsi Sarjana*, Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, 2011), h. 6.



senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antitumor karena uji ini mempunyai kolerasi yang positif dengan potensinya sebagai antitumor maupun fisiologis tertentu. Beberapa penelitian terdahulu menjelaskan bahwa Uji *Brine Shrimp Lethality Test* memiliki korelasi yang signifikan terhadap beberapa bahan baik berupa ekstrak tanaman yang fungsinya sebagai antitumor secara lebih tepat dibandingkan dengan prosedur pemeriksaan sitotoksik yang umum misalnya dengan biakan sel tumor.<sup>64</sup>

*Artemia salina* Leach digunakan sebagai hewan uji karena memiliki kesamaan tanggapan dengan mamalia seperti tipe DNA-dependent RNA polymerase *Artemia salina* Leach serupa dengan yang terdapat pada mamalia dan organisme yang memiliki ouabaine-sensitif Na<sup>+</sup> dan K<sup>+</sup> dependent ATPase, sehingga senyawa maupun ekstrak yang memiliki aktivitas pada sistem tersebut terdeteksi.<sup>65</sup> Selain itu Keistimewaan lain dari *Artemia salina* Leach yaitu memiliki kemampuan beradaptasi dan mempertahankan diri pada kisaran kadar garam yang sangat luas.<sup>66</sup>

Tingkat toksisitas senyawa antikanker terhadap hewan uji dalam ekstrak tumbuhan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dilakukan dengan cara menghitung tingkat kematian larva udang *Artemia salina* Leach. Hasil yang diperoleh dihitung sebagai nilai LC<sub>50</sub>. Suatu senyawa dianggap aktif apabila senyawa memiliki

---

<sup>64</sup>Ridho Bertomi Panjaitan , “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiae cortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)”, h. 12.

<sup>65</sup>Ridho Bertomi Panjaitan , “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiae cortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)”, h. 13.

<sup>66</sup>Mira Marlinda, Meiske S. Sangi dan Audy D. Wu nt. “ Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.)”, h. 26.

nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm dan tingkat kematian dari larva udang sebanyak 50% terhadap ekstrak uji.<sup>67</sup>

#### F. Pelarut Organik

Pelarut organik adalah bahan kimia organik yang mengandung karbon. Pelarut organik biasanya memiliki titik didih rendah dan lebih mudah menguap. Syarat utama penggunaan pelarut untuk ekstraksi senyawa organik yaitu non toksik dan tidak mudah terbakar. Pelarut untuk ekstraksi senyawa organik terbagi menjadi golongan pelarut yang memiliki densitas lebih rendah dari pada air dan pelarut yang memiliki densitas lebih tinggi daripada air.<sup>68</sup>

Beberapa pelarut organik yang biasa digunakan dalam ekstraksi adalah sebagai berikut:<sup>69</sup>

↑ p o l a r u t a s	No.	Pelarut	Titik didih (°C)	Densitas (g/cm <sup>3</sup> )	Konstanta dielektrik	k e k u a t a n  e l u s i
	1	Metanol	65	0,791	33	
	2	Etanol	78	0,789	30	
	3	Aseton	56	0,786	21	
	4	Etil asetat	77	0,894	6,0	
	5	Kloroform	61	1,498	4,8	
	6	Dietil eter	35	0,713	4,3	
	7	Toluena	111	0,867	2,4	
	8	Benzena	80	0,879	2,3	
	9	Heksana	68	0,655	2,0	

Tabel 2.1: Urutan tingkat Kepolaran Pelarut Organik

<sup>67</sup>Vivi Lisdawati, Sumali Wirjowidagdo L. Broto S. Kardono, "Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)" *Bul. Penel. Kesehatan*, vol. 34, no. 3 (2006), h. 112.

<sup>68</sup>Efri Mardawati, et al., "Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya" *Laporan Akhir Penelitian-Penelitian Peneliti Muda UNPAD*, h. 10.

<sup>69</sup>Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 75.

Salah satu pelarut yang digunakan dalam penelitian adalah pelarut etanol. Etanol ( $C_2H_5OH$ ) atau etil alkohol merupakan salah satu jenis alkohol yang merupakan senyawa hidrokarbon yang memiliki gugus hidroksil (OH) dengan 2 atom karbon. Etanol memiliki sifat tidak berwarna, mudah menguap serta dapat bercampur dengan air karena memiliki sifat kepolaran yang sama. Ada 2 jenis etanol yaitu etanol sintetis yang sering disebut alkohol kayu yang terbuat dari etilen yang merupakan salah satu turunan senyawa minyak bumi atau batu bara. Bahan ini diperoleh dari sintesis kimia yang disebut hidrasi sedangkan jenis yang kedua adalah bioetanol yang diperoleh dari biomassa (tanaman) melalui proses biologi (enzimatik dan fermentasi).<sup>70</sup>

Pemilihan pelarut dalam ekstraksi akan mempengaruhi hasil kandungan senyawa metabolit sekunder yang diperoleh. Pemilihan pelarut ekstraksi pada umumnya menggunakan prinsip *like dissolves like* dimana senyawa yang polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa nonpolar akan larut pada senyawa nonpolar.

Pemilihan pelarut etanol dalam penelitian didasarkan pada beberapa pertimbangan yaitu, menurut Phongpaichit et al. (2004) etanol merupakan pelarut terbaik yang dapat melarutkan terutama senyawa-senyawa metabolit polar bersama-sama dengan senyawa yang memiliki tingkat kepolaran rendah. Pelarut etanol secara efisien menembus ke dalam membran sel, sehingga diperoleh komponen endoseluler yang menyebabkan rendemen menjadi tinggi. Menurut Wilbraham dan Matta (1992) pelarut etanol memiliki gugus hidroksil yang menyebabkannya dapat mengikat senyawa-senyawa polar dan gugus alkil yang dapat mengikat senyawa-senyawa non

---

<sup>70</sup> Efri Mardawati.,*et.al.*, “ Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L*) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya “, h. 15.

polar. Selain itu menurut Filho (2006) ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol sangat efektif dalam mengisolasi senyawa-senyawa bioaktif. Senyawa-senyawa yang dapat diikat oleh pelarut etanol antara lain fixed oils, lemak, lilin, alkaloid, flavonoid, poliphenol, tanin, saponin, aglikon dan glikosida.<sup>71</sup>



---

<sup>71</sup>Fathul Yusro, "Rendemen Ekstrak Etanol dan Uji Fitokimia Tiga Jenis Tumbuhan Obat Kalimantan Barat(Rendement of Ethanol Extracts and Phytochemical Tests In Three of Species Medicinal Plants of West Borneo) "*Jurnal*", h. 32.

### BAB III

#### METODOLOGI PENELITIAN

##### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian dimulai bulan Mei-Oktober 2014 di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Teknologi, Laboratorium Fitokimia Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar dan Laboratorium Organik Fakultas MIPA, UNHAS.

##### B. Alat dan Bahan

###### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, *rotary evaporator*, chamber, corong *sintered glass*, lampu UV 254-366 nm, lampu pijar, kolom kromatografi gravitasi, neraca analitik, oven, alat penyemprot, pompa vakum, pipa kapiler, kaca pembesar, mikropipet, botol vial, cutter dan alat spektrofotometer FTIR Prestige 21 merek Shimadzu.

###### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*), akuades, akuabides, pelarut etanol, metanol, n-heksana, etil-asetat, kloroform, aseton, dimetil sulfoksida (DMSO) pereaksi mayer, pereaksi Liebermann-Buchard, besi klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) 5%, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 10%, asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) pekat, natrium hidroksida (NaOH) 10%, natrium klorida (NaCl) murni, silika G<sub>60</sub> (230-400 mesh) Merck nomor katalog 7730, 7733 dan 7734, silika gel G<sub>60</sub> PF 254, aluminium foil, kertas saring dan telur *Artemia salina* Leach.

### **C. Prosedur Penelitian**

#### **1. Preparasi Sampel**

Kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) dibersihkan kemudian ditumbuk sampai berbentuk serbuk dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

#### **2. Ekstraksi**

Kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) yang telah dikeringkan sebanyak 1000 gram dimaserasi dengan pelarut etanol selama 1x24 jam (3 kali). Ekstrak yang diperoleh dipekatkan menggunakan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.

#### **3. Fraksinasi**

Ekstrak kental etanol yang diperoleh dianalisis menggunakan KLT dengan larutan pengembang (eluen) yaitu n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 8:2 kemudian dilanjutkan dengan kromatografi kolom cair vakum. Fasa gerak yaitu larutan pengembang yang diperoleh dari hasil KLT yang kepolarannya terus ditingkatkan yaitu 100% n-heksana, n-heksana:etil asetat (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), 100% etil asetat dan 100% metanol. Hasil fraksinasi dianalisis menggunakan KLT dengan eluen n-heksana:etil asetat 8:2 dan fraksi-fraksi yang mempunyai nilai  $R_f$  yang sama digabung. Fraksi yang sudah digabung dan terdapat tanda kristal dilanjutkan pada kromatografi kolom gravitasi dengan perbandingan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya yaitu 100% n-heksana, n-heksana:etil asetat (9:1, 8:2, 7:3 dua kali, 6:4 dua kali, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) dan 100% etil asetat. Fraksi yang menghasilkan banyak kristal dilanjutkan dengan KLT, uji fitokimia dan pemurnian.

#### 4. Pemurnian

Pemurnian dilakukan dengan cara kristalisasi dan rekristalisasi dengan pelarut n-heksana sehingga diperoleh isolat murni yang berwarna putih kekuningan yang ditandai dengan hasil KLT yang menunjukkan satu noda dan pengujian 3 sistem eluen. menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:kloroform (5:5) dan kloroform: etil asetat (2:8) kristal murni dilanjutkan dengan identifikasi dengan uji fitokimia yang dilanjutkan karakterisasi dengan menggunakan alat spektrofotometer FTIR serta uji toksisitas.

#### 5. Identifikasi

Ekstrak pekat etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*), fraksi hasil kromatografi kolom cair vakum dan kristal murni dilarutkan sedikit dengan menggunakan pelarut etanol sampai homogen kemudian dilanjutkan dengan uji fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam sampel.

##### a. Uji Flavonoid

##### 1) Test dengan $H_2SO_4$ pekat

Sampel diencerkan menggunakan beberapa mL alkohol kemudian dipipet ke dalam plat tetes dan ditetesi dengan  $H_2SO_4$  pekat. Perubahan warna yang terjadi diamati dari kuning tua menjadi merah tua.

##### 2) Test dengan NaOH 10%

Sampel diencerkan menggunakan beberapa mL alkohol kemudian dipipet ke dalam plat tetes dan ditetesi dengan NaOH 10%. Perubahan warna yang terjadi diamati dari kuning muda sampai kuning tua.

**3) Test dengan  $\text{FeCl}_3$  5%**

Sampel diencerkan menggunakan beberapa mL alkohol kemudian dipipet ke dalam plat tetes dan ditetesi dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  5%. Perubahan warna yang terjadi adalah biru hitam atau hijau kekuningan.

**b. Uji Alkaloid****1) Test dengan Pereaksi Mayer**

Sampel yang telah diencerkan dengan beberapa mL alkohol kemudian dipipet ke dalam plat tetes dan ditetesi dengan pereaksi Mayer positif jika terbentuk endapan putih atau kuning yang larut dalam metanol.

**2) Test dengan Pereaksi Dragendorff**

Sampel yang telah diencerkan dengan beberapa mL alkohol kemudian dipipet ke dalam plat tetes dan ditetesi dengan pereaksi Dragendorff positif jika terbentuk larutan yang berwarna coklat.

**3) Test dengan Pereaksi Wagner**

Sampel yang telah diencerkan dengan beberapa mL alkohol kemudian dipipet ke dalam plat tetes dan ditetesi dengan pereaksi Wagner positif jika terbentuk endapan yang berwarna jingga.

**c. Uji Terpenoid dan Steroid**

Sampel yang telah diencerkan dengan beberapa mL alkohol kemudian dipipet ke dalam plat tetes dan ditetesi dengan pereaksi Lieberman burchard. Positif apabila terbentuk larutan berwarna merah-ungu (terpenoid) dan terbentuk warna biru atau hijau (steroid).



## 6. Karakterisasi dengan Spektrofotometer FTIR

Isolat murni dari hasil isolasi diambil 1 mg, kemudian dilarutkan kedalam KBr dengan cara digerus sampai homogen. Campuran dimasukkan kedalam alat pembuat pellet dengan tekanan 74 atm dan waktu 5 menit sehingga didapatkan pellet dengan ketebalan  $\pm 1$  mm. Plat diletakkan pada wadah plat kemudian diukur serapannya dengan alat FTIR.

## 7. Uji Toksisitas Larva *Udang Artemia salina* Leach

### 1) Penetasan Larva *Udang Artemia salina* Leach

Disiapkan wadah untuk penetasan telur udang *Artemia salina* Leach dalam satu ruang dimana ditempatkan dalam keadaan yang berbeda yaitu terang dan gelap. Kemudian ditimbang NaCl laut sebanyak 3,8 gram dan dilarutkan dalam 100 mL aquabides. Larutan NaCl dimasukkan ke dalam wadah. Ke dalam masing-masing wadah yang berisi larutan garam dimasukkan telur *Artemia salina* Leach ke dalam ruang yang gelap untuk ditetaskan dan didiamkan selama 48 jam.

### 2) Pembuatan Larutan Sampel

Sampel yaitu ekstrak, fraksi dan isolat murni masing-masing ditimbang sebanyak 1 mg ke dalam botol vial dan dilarutkan dengan 100  $\mu$ L DMSO kemudian diencerkan dengan 150  $\mu$ L aquabidest sehingga volume menjadi 250  $\mu$ L kemudian diambil 200  $\mu$ L dan diencerkan dengan 600  $\mu$ L aquabides hingga volume sampel menjadi 800  $\mu$ L sehingga konsentrasi sampel menjadi 1000 ppm. Selanjutnya melakukan pengenceran ke dalam mikropate. Mikropate yang disediakan sebanyak 7 dan diberi kode A sampai G. Mikropate A dan B diisi masing-masing sebanyak 100  $\mu$ L sampel. Kedalam baris B sampai G dimasukkan aquabides sebanyak 100  $\mu$ L.

Dari baris B dipipet sebanyak 100  $\mu$ L dimasukkan ke dalam baris C sampai seterusnya yaitu sampai baris G.

**3) Uji Toksisitas terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode BST**

Larva udang *Artemia salina* Leach yang telah menetas dipipet 100  $\mu$ L kedalam mikropate A sampai G yang masing-masing berisi ekstrak, fraksi dan isolat murni. Kemudian diinkubasi selama 24 jam kemudian dihitung jumlah larva yang mati dan hidup pada mikropate.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Pengamatan

Sampel kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) yang telah dipreparasi kemudian dimaserasi sebanyak 1.000 gram dengan menggunakan pelarut etanol selama 1x24 jam (3 kali) menghasilkan ekstrak kental sebanyak 46,4638 gram. Selanjutnya ekstrak kental di uji fitokimia dan uji KLT untuk mengetahui eluen yang cocok untuk fraksinasi dengan kromatografi kolom cair vakum (KKCV) dengan berbagai perbandingan pelarut. Hasil KLT menunjukan eluen yang cocok adalah eluen n-heksana:etil asetat (8:2). Hasil ekstrak kental yang telah diuji fitokimia mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid dan alkaloid.

Ekstrak kental etanol selanjutnya dilakukan proses fraksinasi awal yaitu dengan kromatografi kolom cair vakum (KKCV) dengan berbagai perbandingan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya, yaitu pelarut 100% n-heksana, n-heksana:etil asetat (9:1 dua kali, 8:2 tiga kali, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), 100% etil asetat dan 100% metanol sehingga menghasilkan 15 fraksi. Fraksi yang diperoleh kemudian di KLT dengan menggunakan eluen n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 8:2. Fraksi yang memiliki noda yang sama digabung. Fraksi gabungan yang diperoleh setelah KLT adalah 6 fraksi diantaranya fraksi A (fraksi 1), fraksi B (fraksi 2), fraksi C (fraksi 3) fraksi D (fraksi 4-9), fraksi E (10-14) dan fraksi F (fraksi 15).

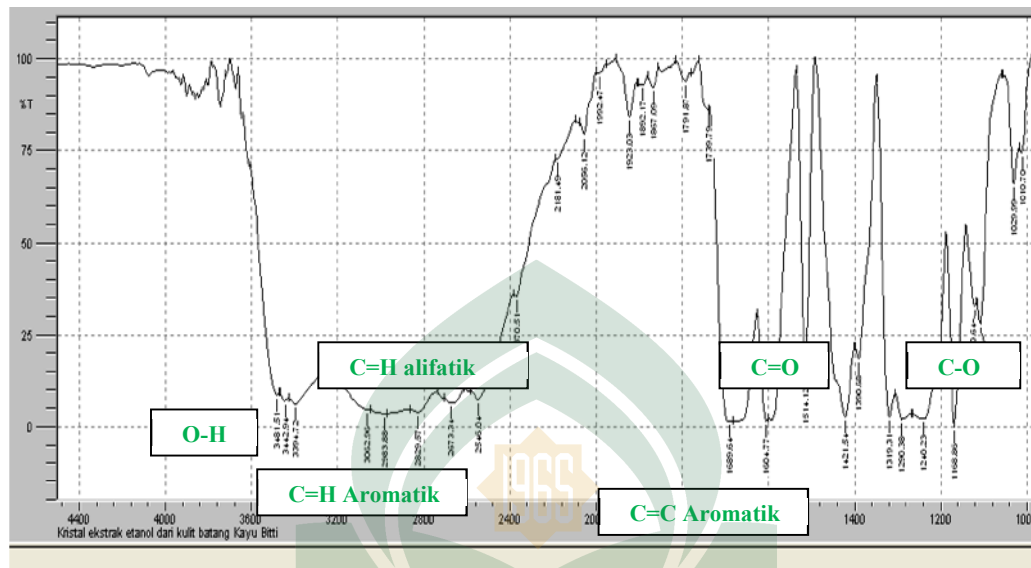
Fraksi yang digabung yang menunjukan ada tanda-tanda kristal dilanjutkan dengan kromatografi kolom gravitasi. Fraksi yang dilanjutkan adalah fraksi D. Dari hasil kromatografi kolom gravitasi menghasilkan 50 fraksi. Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian diKLT dengan menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (8:2).

Dari hasil KLT diperoleh fraksi yang memiliki noda yang sama yaitu fraksi D1 (fraksi 9-14) fraksi D2 (fraksi 15-16) fraksi D3 (17), fraksi D4 (18) dan fraksi D5 (19). Fraksi yang terbentuk kristal adalah fraksi D4 kemudian dilanjutkan dengan proses kristalisasi dan rekristalisasi dengan menggunakan pelarut n-heksana sehingga menghasilkan isolat murni berbentuk amorf yang berwarna putih kekuningan dengan berat 0,0183 gram. Kristal kemudian dianalisis dengan KLT menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (7:3) dan menunjukkan satu noda. Uji kemurnian kristal dilakukan melalui uji KLT tiga sistem eluen dengan menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:kloroform (5:5) dan kloroform:etil asetat (2:8) dan masing-masing menunjukkan satu noda seperti pada gambar di bawah ini:



**Gambar 4.1: Kromatogram Hasil KLT uji tiga Sistem Eluen (a) eluen heksana: etil asetat (7:3) Rf 0,27 (b) eluen heksana:kloroform (5:5) Rf 0,72 dan (c) eluen kloroform:etil asetat (2:8) Rf 0,9**

Identifikasi selanjutnya adalah uji fitokimia isolat murni. Hasil yang diperoleh adalah yang diperoleh isolat murni mengandung senyawa flavonoid karena positif terbentuk warna hijau kekuningan dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ , terbentuk warna kuning muda dengan pereaksi  $\text{NaOH}$  10% dan terbentuk warna kuning tua dengan pereaksi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Isolat murni yang diperoleh dikarakterisasi dengan menggunakan spektrofotometer IR seperti pada gambar berikut:



Gambar 4.2: Spektrum IR Kristal

Ekstrak kental, fraksi gabungan yaitu fraksi D dan isolat murni selanjutnya dilakukan uji toksisitas dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan hewan uji *Artemia salina* Leach. Nilai toksisitas dari suatu senyawa dilihat dari nilai  $LC_{50}$ . Senyawa dikatakan toksik apabila nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm. Nilai  $LC_{50}$  yang didapat dari ekstrak kental, fraksi D dan Kristal seperti pada tabel di bawah ini:

Tabel 4.1: Uji Tojksisitas

No.	Sampel	Nilai $LC_{50}$ ( $\mu$ L/mg)	Keterangan
1.	Ekstrak kental	29,51	Sangat Toksik
2.	Fraksi D	169,82	Toksik
3.	Isolat murni	562,34	Toksik

## **B. Pembahasan**

### **1. Ekstraksi**

Kulit batang dikeringkan dalam suhu kamar agar tidak terkena cahaya matahari langsung. Sebagian besar senyawa metabolit sekunder dalam sampel akan rusak oleh panas matahari langsung. Pengeringan bertujuan untuk mempermudah membuat serbuk dan mengurangi kadar air dalam sampel sehingga tidak ditumbuhi jamur. Reaksi enzimatis dan perubahan kimiawi sampel dapat menyebabkan senyawa aktif dalam sampel akan hilang terurai.<sup>72</sup> Sampel yang telah dikeringkan ditumbuk sampai berbentuk serbuk yang bertujuan untuk memperluas permukaan yang kontak langsung dengan pelarut sehingga proses ekstraksi berlangsung lebih sempurna. Semakin halus serbuk, maka kelarutan akan meningkat karena semakin banyak terjadi kontak dengan pelarut, maka semakin banyak zat yang dapat terbentuk dan semakin efisien proses pemisahan atau ekstraksi yang terjadi.

Ekstraksi merupakan teknik pemisahan sejumlah bahan padat yang terdapat pada jaringan tumbuhan. Ekstraksi yang dipilih dalam penelitian adalah ekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi merupakan teknik ekstraksi dengan cara perendaman sampel menggunakan pelarut pada temperatur kamar. Pemilihan teknik ekstraksi maserasi memiliki beberapa keuntungan yaitu pengerjaannya mudah, sangat cocok untuk senyawa metabolit sekunder yang tidak tahan panas dan dapat melarutkan banyak senyawa metabolit sekunder kecuali bahan yang mudah mengembang. Ekstraksi bahan aktif dari jaringan tumbuhan mempunyai prinsip

---

<sup>72</sup>Ridho Bertomi Panjaitan, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxlae cortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)” h. 35.

pelarut harus berdifusi ke dalam dinding sel dan selanjutnya zat aktif harus cukup larut di dalam pelarut. Dengan demikian akan dicapai kesetimbangan antara pelarut dan zat terlarut.

Pemilihan pelarut yang digunakan dalam maserasi harus pelarut yang ideal yaitu pelarut yang menunjukkan selektivitas maksimal, mempunyai kapasitas terbaik yang ditinjau dari koefisien saturasi bahan dalam medium dan kompatibel dengan sifat-sifat bahan yang diekstraksi serta memiliki prinsip *like dissolves like* yaitu senyawa polar dapat larut dalam pelarut polar dan senyawa nonpolar dapat larut dalam pelarut nonpolar. Pelarut yang dipakai dalam proses maserasi adalah pelarut etanol. Pelarut etanol dipilih karena etanol merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang polar dan senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang rendah.<sup>73</sup> Pelarut etanol memiliki gugus hidroksil yang menyebabkan dapat mengikat senyawa-senyawa polar seperti flavonoid dan alkaloid. Maserasi dilakukan selama 1x24 jam (3 kali) dan menghasilkan maserat yang berwarna coklat. Maserat selanjutnya dievaporasi yang bertujuan untuk memekatkan maserat sehingga menghasilkan ekstrak kental etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*).

## 2. Fraksinasi

Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan KLT yang merupakan identifikasi awal untuk menentukan jumlah senyawa dari ekstrak kental serta pendeteksian awal dari hasil isolasi. KLT juga bertujuan untuk mengetahui eluen yang bagus untuk proses fraksinasi awal dengan kromatografi kolom cair vakum. Eluen yang dipakai dicoba dengan berbagai perbandingan pelarut mulai dari yang kepolarannya rendah sampai yang kepolarannya tinggi. Eluen dikatakan bagus

---

<sup>73</sup> Goeswin Agus, *Teknologi Bahan Alam*, h. 33.

apabila memiliki pola pemisahan yang paling baik daripada eluen lain karena memberikan noda terbanyak dan terpisah baik serta jarak antar noda cukup terpisah. Eluen yang sesuai yang dipakai adalah eluen n-heksana:etil asetat (8:2) dengan  $R_f$  senyawa adalah 0,36. Fase diam berupa plat KLT silika G<sub>60</sub> PF 254 dan penampak noda lampu UV 254-366 nm dan cairan penyemprot penampak noda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%. Asam sulfat dipakai karena asam sulfat merupakan penampak noda yang umum untuk senyawa metabolit sekunder maupun senyawa metabolit primer.<sup>74</sup> Selain diuji KLT ekstrak kental juga dilakukan uji fitokimia yang bertujuan untuk mengetahui jenis-jenis senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak. Dari hasil uji fitokimia diperoleh bahwa ekstrak kental etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) mengandung senyawa metabolit sekunder jenis flavonoid dan alkaloid. Hal ini disebabkan karena pelarut etanol memiliki sifat yang polar sehingga dapat mengikat senyawa metabolit sekunder yang polar. Ekstrak kental masih banyak mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder oleh karena itu harus dipisahkan menjadi senyawa yang lebih sedikit sehingga harus dilakukan proses fraksinasi.

Fraksinasi adalah proses pemisahan komponen-komponen senyawa dalam ekstrak kental menjadi fraksi. Fraksinasi awal dilakukan dengan kromatografi kolom cair vakum. Fase diam yang dipakai adalah silika G<sub>60</sub> Merck nomor katalog 7730. Ekstrak kental diimpregnasi dengan silika G<sub>60</sub> Merck nomor katalog 7733. Tujuan dari proses impregnasi adalah agar sampel yang akan difraksinasi dapat tersebar dengan homogen dan diharapkan hasil pemisahannya baik. Fase diam dikemas ke dalam kolom kromatografi kolom cair vakum yaitu kolom berupa corong *sintered glass*. Pengemasan kolom harus betul-betul rapat yang bertujuan agar proses elusi dan

---

<sup>74</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 78.



pemisahan senyawanya sempurna. Fase gerak berupa eluen yang ditingkatkan terus kepolarannya. Eluen yang dipakai adalah 100% n-heksana, n-heksana:etil asetat (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), 100% etil asetat dan 100% metanol. Hal ini dilakukan bertujuan agar senyawa yang diinginkan terelusi dalam bentuk fraksi-fraksi. Kromatografi kolom cair vakum dibantu dengan tekanan dari pompa vakum sehingga laju aliran fase gerak meningkat. Fraksi yang terelusi bersama dengan eluen ditampung ke dalam mangkok kaca dan menghasilkan warna fraksi yang beragam.

Fraksi yang diperoleh dari hasil fraksinasi awal adalah sebanyak 15 fraksi. Fraksi-fraksi yang didapat selanjutnya di KLT dengan eluen n-heksan:etil asetat (8:2) yang bertujuan agar senyawa-senyawa yang memiliki penampakan noda yang sama pada KLT digabung. Hasil fraksi gabungan yaitu terdiri dari fraksi A, fraksi B, fraksi C, fraksi D, fraksi E dan fraksi F. Dari keenam fraksi, fraksi yang menunjukkan tanda-tanda kristal adalah fraksi D yang berbentuk pasta kering. Hasil uji fitokimia menunjukkan mengandung senyawa metabolit jenis flavonoid dan alkaloid. Fraksi ini belum murni sehingga dilakukan pemurnian melalui kromatografi kolom gravitasi.

Fraksinasi dengan kromatografi kolom gravitasi bertujuan untuk mendapatkan senyawa murni. Kromatografi kolom gravitasi memiliki prinsip yang sama dengan kromatografi kolom cair vakum yaitu sampel dielusi dengan eluen yang memiliki tingkat kepolaran yang rendah sampai eluen yang memiliki tingkat kepolaran tinggi. Fase diam berupa silika G<sub>60</sub> Merck nomor katalog 7734. Fraksi D diimpregnasi dengan menggunakan silika G<sub>60</sub> Merck nomor katalog 7733. Proses pengemasan silika di dalam kolom memiliki prinsip yang sama dengan proses pengemasan silika pada kromatografi kolom cair vakum yaitu silika harus benar-benar rapat dan tidak ada ruang kosong. Hal ini bertujuan agar proses elusi sampel

sempurna. Proses elusi dilakukan dengan metode bergradien, sehingga elusi diawali dengan eluen tunggal n-heksana yang bersifat non polar kemudian divariasi dengan eluen yang lebih polar. Fase gerak dibiarkan mengalir melalui kolom yang disebabkan oleh gaya dorong gravitasi, dimana pita senyawa terlarut akan bergerak dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari kolom.<sup>75</sup> Dari hasil kromatografi kolom gravitasi didapatkan 50 fraksi. Fraksi-fraksi yang dihasilkan dilanjutkan dengan proses KLT yang bertujuan untuk melihat penampakan noda yang sama. Penggabungan fraksi menghasilkan 5 fraksi gabungan. Fraksi yang dilanjutkan untuk pemurnian adalah fraksi D4.

### 3. Pemurnian

Untuk mengetahui kemurnian dari isolat yang dihasilkan dari kromatografi kolom gravitasi maka dilakukan uji kemurnian komponen hasil pemisahan dengan kromatografi lapis tipis hingga tampak satu noda tunggal pada minimal tiga sistem eluen. Selain itu jika senyawa tersebut telah murni akan memberikan noda tunggal dalam eluen apapun. Apabila senyawa belum murni maka dilanjutkan pemurnian dengan cara kristalisasi dan rekristalisasi. Teknik rekristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai. Pada proses kristalisasi terjadi kesetimbangan antara molekul dalam larutan dan kesetimbangan dengan kisi-kisi kristalnya.<sup>76</sup> Proses pemurnian isolat D4 dilakukan dengan pelarut n-heksana. Masalah utama dalam kristalisasi adalah pemilihan pelarut yang sesuai untuk melarutkan zat-zat pengotor. Pelarut ideal untuk kristalisasi adalah tidak bereaksi dengan senyawa yang akan dikristalkan,

---

<sup>75</sup>Nolika Wiji Jayanti, *et.,al*, "Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Aktif dari Ekstrak Metilena Klorida (MTC) Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* (l)willd)", *Chem. Prog. Vol. 5, No.2.*(2012), h. 102.

<sup>76</sup> Firdaus Zenta, *Laporan Hibah penulisan buku ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*, h. 53.

bersifat volatil sehingga mudah dipindahkan dari kristal. Kristal yang diperoleh dari hasil rekristalisasi adalah kristal berwarna putih kekuningan yang selanjutnya dilakukan kembali uji tiga sistem eluen. Eluen yang digunakan adalah eluen n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:kloroform (5:5) dan kloroform: etil asetat (2:8). Penampakan satu noda dari tiga sistem eluen membuktikan bahwa kristal yang diperoleh telah murni. Selanjutnya dilakukan uji fitokimia yang bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada kristal yang sangat berguna dalam menentukan golongan utama dari senyawa bioaktifnya. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat murni mengandung jenis senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid karena positif dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ , NaOH 10% dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik yang memiliki banyak gugus OH dengan adanya perbedaan keelektronegatifan yang tinggi sehingga sifatnya polar. Golongan senyawa ini mudah terekstrak dalam pelarut polar seperti etanol yang memiliki sifat polar karena adanya gugus hidroksil sehingga dapat terbentuk ikatan hidrogen.<sup>77</sup>

#### **4. Karakterisasi dengan Spektrofotometer FTIR**

Spektroskopi inframerah (IR) digunakan untuk mengetahui jenis gugus fungsi dalam suatu jaringan tumbuhan yang diisolasi. Tampilan spektrum menunjukkan puncak-puncak yang menunjukkan gugus-gugus tertentu dengan grafik perbandingan serapan bilangan gelombang terhadap transmitan (%T). Hasil karakterisasi IR terhadap kristal murni memperlihatkan adanya serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi, diantaranya adalah pada daerah panjang

---

<sup>77</sup>Elok Kamilah Hayati dan Nurhalimah, "Pytochemical Test and Brine Shrimp Lethality Test Against *Artemia salina* Leach of Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) Plant Extract "h. 79

gelombang  $3442,94\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya serapan melebar sebagai vibrasi regang O-H terikat yang khas untuk gugus hidroksil tapi dengan intensitas sangat lemah dan frekuensi yang lebar sehingga hasil serapan tidak terdeteksi. Serapan pada panjang gelombang  $3062,96\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan pita serapan untuk C-H aromatik. Vibrasi pada bilangan gelombang  $2983,88\text{ cm}^{-1}$  dan  $2829,57\text{ cm}^{-1}$  memberi petunjuk adanya vibrasi C-H alifatik. Serapan khas untuk gugus C=C aromatik terletak pada bilangan gelombang  $1689,64\text{ cm}^{-1}$ . Sedangkan serapan untuk gugus fungsi C=O terletak pada bilangan gelombang  $1604,77\text{ cm}^{-1}$ . Vibrasi yang tajam pada daerah bilangan gelombang  $1168,86\text{ cm}^{-1}$  menandakan adanya vibrasi dari gugus C-O. Berdasarkan data spektroskopi IR dapat diketahui bahwa senyawa yang terdapat dalam kristal yang mempunyai vibrasi gugus O-H, gugus C-H aromatik, gugus C-H alifatik, gugus C=C aromatik, gugus C=O, serta gugus C-O mengindikasikan sebagai senyawa flavonoid.

### 5. Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan skrining awal untuk pencarian obat antikanker karena telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa antikanker. Penelitian ini menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Larva udang (*Artemia salina* Leach) merupakan organisme sederhana dari biota laut yang sangat kecil dan mempunyai kepekaan yang cukup tinggi terhadap toksik. Penetasan telur *Artemia salina* Leach menggunakan wadah penetasan yang dipisahkan yaitu antara yang gelap dan terang. Yang gelap adalah tempat penetasan. Telur udang *Artemia*

*salina* Leach ditetaskan dengan menggunakan 3,8 gram garam laut murni yang dilarutkan dengan 100 mL aquabidest. Kemudian diinkubasi selama 48 jam.<sup>78</sup>

Sampel yaitu ekstrak kental, fraksi gabungan (fraksi D) dan isolat murni masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan 100 µL DMSO. Hal ini dilakukan karena pelarutan sampel dengan menggunakan air laut sering menimbulkan masalah karena adanya perbedaan tingkat kepolaran. Sampel tidak mampu larut dengan air laut sehingga digunakan DMSO untuk melarutkannya.<sup>79</sup>. Sampel yang telah dilarutkan dengan DMSO diencerkan dengan aquabidest sehingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Pengerjaan dilakukan dengan triplo dan konsentrasi hasil pengenceran yaitu 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, 15,625 ppm dan 7,8125 ppm. Udang *Artemia salina* Leach yang telah menjadi larva dipipet sebanyak 7-15 ekor ke dalam wadah pengujian dan ditambah dengan sampel yaitu sebanyak 100 µL. Selanjutnya sampel yang telah dikontakkan dengan larva diinkubasi selama 1x24 jam kemudian dihitung jumlah larva yang mati kemudian dihitung persen kematian (mortalitas) dengan menggunakan persamaan:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Presentasi kematian larva dapat digunakan untuk menghitung nilai probit yang selanjutnya dapat diketahui nilai LC<sub>50</sub> yang diperoleh dari nilai grafik. Nilail sampel

---

<sup>78</sup> Lilybeth F. Olowa dan Olga M. Nuñez, “Brine Shrimp Lethality Assay of the Ethanolic Extracts of Three Selected Species of Medicinal Plants from Iligan City, Philippines”, h. 75.

<sup>79</sup> Elok Kamilah Hayati dan Nurhalimah, “Pytochemical Test and Brine Shrimp Lethality Test Against *Artemia salina* Leach of Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) Plant Extract”, h. 78.

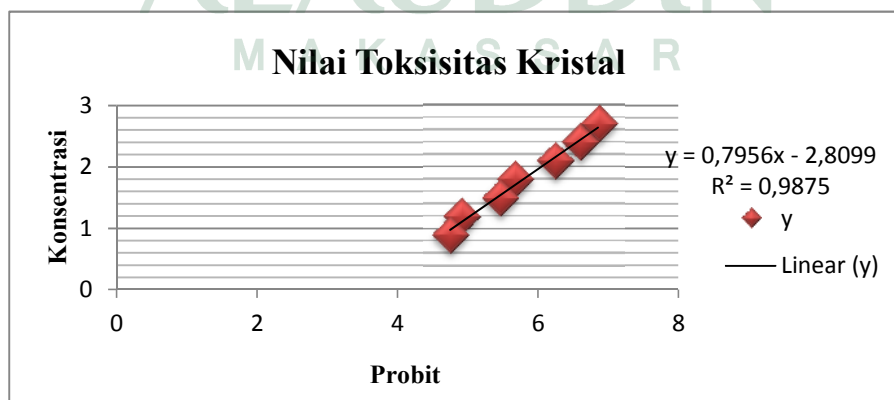
yaitu ekstrak kental, fraksi gabungan (fraksi D) dan isolat murni dapat dilihat dari grafik berikut ini:



Grafik 4.1: Nilai toksisitas Ekstrak



Grafik 4.2: Nilai Toksisitas Fraksi D



Grafik 4.3: Nilai toksisitas isolat murni

Dari grafik dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi, semakin besar pula persen mortalitas (kematian) sehingga nilai probitnya pun semakin tinggi baik pada ekstrak kental, fraksi D maupun isolat murni. Hal ini disebabkan karena cara kerja senyawa yang terdapat dalam sampel yaitu ekstrak kental, fraksi D dan kristal isolat dalam membunuh larva udang *Artemia salina* Leach. *Artemia salina* Leach. bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Oleh karena itu, apabila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini akan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan.<sup>80</sup> Dengan mengetahui kematian larva *Artemia salina* Leach kemudian dicari angka probit melalui tabel probit dan dibuat persamaan garis:  $y = ax + b$  dimana sumbu y adalah log konsentrasi dan sumbu x adalah angka probit. Dari persamaan tersebut kemudian dihitung  $LC_{50}$  dengan memasukkan nilai  $y = ax + b$ . Nilai  $LC_{50}$  yang didapat dari ketiga sampel yang didapat terlihat seperti pada tabel berikut:

Tabel 4.2: Uji Toksisitas

No.	Sampel	Nilai $LC_{50}$ ( $\mu$ L/mg)	Keterangan
1.	Ekstrak kental	29,51	Sangat Toksik
2.	Fraksi D	169,82	Toksik
3.	Isolat murni	562,34	Toksik

<sup>80</sup>Arter D. Muaja, Harry S. J. Koleangan dan Max R. J. Runtuwene, "Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi,, h. 118.

Nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan menunjukkan bahwa yang paling toksik diantara ketiga sampel adalah ekstrak kental. Suatu senyawa dianggap sangat toksik apabila senyawa memiliki nilai  $LC_{50} < 30$  ppm, toksik dengan nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm dan tidak toksik apabila  $LC_{50} > 1000$  ppm dan tingkat kematian dari larva udang sebanyak 50% terhadap ekstrak uji.<sup>81</sup> Tingginya toksisitas dari ekstrak kental dibandingkan dengan fraksi D dan isolat murni disebabkan karena didalam ekstrak kental masih banyak mengandung senyawa metabolit sekunder jenis flavonoid dan alkaloid.

Senyawa flavonoid dan alkaloid terbukti toksik sebagai antikanker. Hal ini disebabkan karena flavonoid sebagai antioksidan yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Mekanisme apoptosis sel pada teori ini akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi ini diawali dengan dilepasnya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Efek lainnya adalah flavonoid sebagai penghambat proliferasi tumor/kanker yang salah satunya dengan menginhibisi aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke sel inti. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhan keganasan sel kanker. Flavonoid juga berfungsi untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi.<sup>82</sup> Penyebab lain flavonoid dapat membunuh sel kanker disebabkan karena adanya menyebabkan gugus OH- pada flavonoid berikatan dengan protein integral membran sel. Hal ini menyebabkan

---

<sup>81</sup>Vivi Lisdawati, Sumali Wiryowidagdo L. Broto S. Kardono, “*Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)* dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)”, h. 112.

<sup>82</sup>Arter D. Muaja, Harry S. J. Koleangan dan Max R. J. Runtuwene, “Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi”, h. 118.



terbendungnya transpor aktif  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ . Transpor aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion  $\text{Na}^+$  yang tidak terkendali ke dalam sel, hal ini menyebabkan pecahnya membran sel. Pecahnya membran sel inilah yang menyebabkan kematian sel.<sup>83</sup>

Alkaloid yang berasal dari tumbuhan memiliki mekanisme sitotoksik yaitu berperan sebagai *tubulin inhibitor*. Pada proses siklus sel alkaloid berikatan dengan tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus. Terikatnya tubulin pada alkaloid mengakibatkan polimerisasi protein menjadi mikrotubulus akan terhambat sehingga pembentukan *spindle* mitotik akan terhambat pula dan siklus sel akan terhenti pada metaphase. Karena tidak dapat melakukan pembelahan sel, sel tersebut kemudian akan mengalami apoptosis.<sup>84</sup>




---

<sup>83</sup>Awik Puji Dyah Nurhayati, Nurlita Abdulgani dan Rachmat Febrianto, “Uji Toksisitas Ekstrak Eucheuma Alvarezii terhadap *Artemia Salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker” *Akta Kimindo Vol. 2 No. 1*”. (2006). h. 118.

<sup>84</sup>Ridho Bertomi Panjaitan , “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiae cortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BST)*”, h. 52.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **A. Kesimpulan**

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Senyawa bioaktif antikanker yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) adalah senyawa metabolit sekunder jenis flavonoid.
2. Nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan dari metode *Brine Shrimp Lethality Test (BST)* menggunakan larva *Artemia salina* Leach adalah untuk ekstrak kental 29,51 ppm, fraksi D 169,82 ppm dan kristal 562,34 ppm.

#### **B. Saran**

Saran untuk penelitian selanjutnya:

1. Perlu dilakukan karakterisasi lanjutan kristal menggunakan uji spektroskopi GC-MS dan NMR.
2. Perlu dilakukan uji kandungan senyawa bioaktif semua komponen dari tumbuhan Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) yang meliputi daun, buah dan akar.

## DAFTAR PUSTAKA

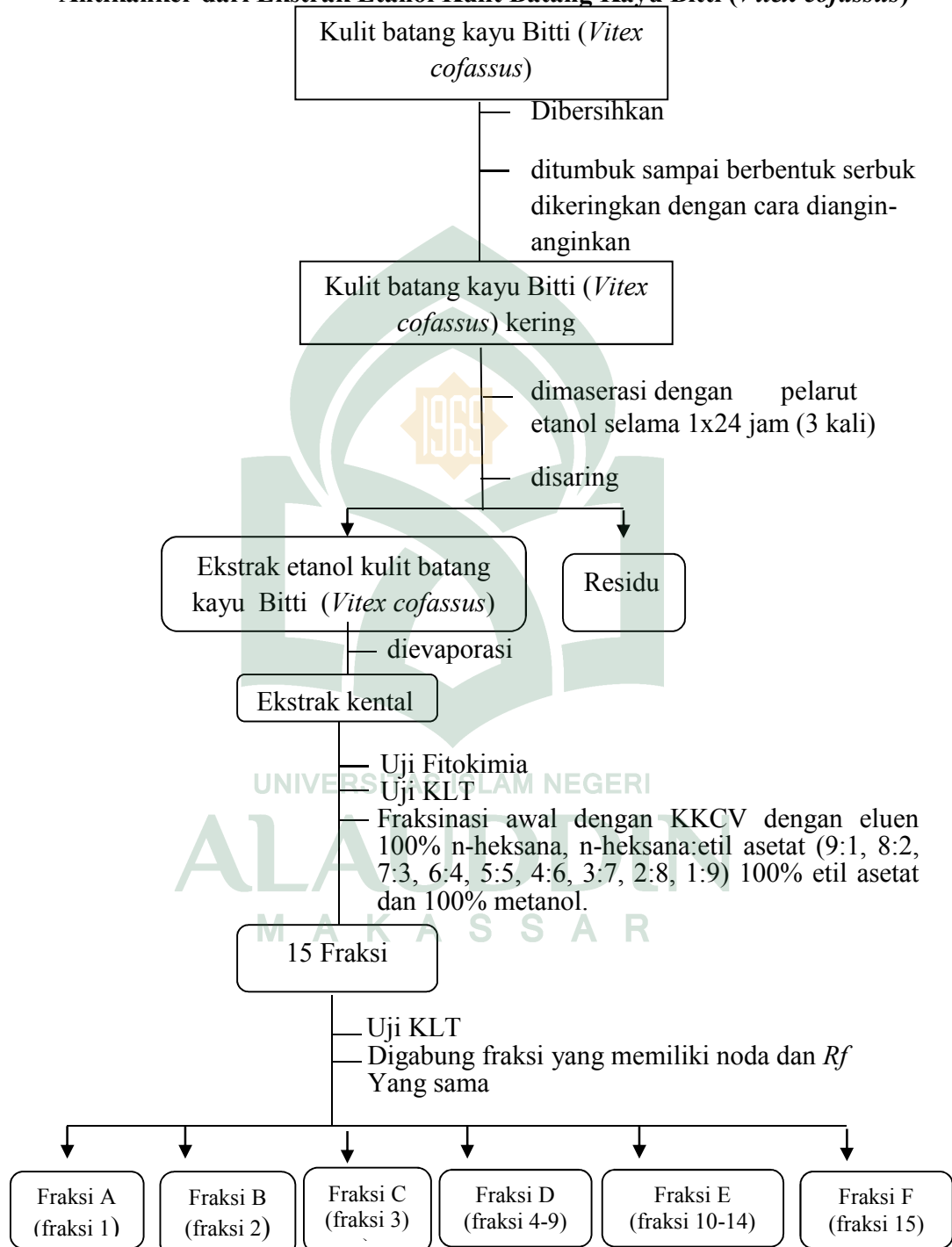
- Agus, Goeswin, *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: ITB, 2007.
- Alamgir, Anm, Minhajur Rahman dan Ataur Rahman,“ Phytochemical characteristics, antimitotic, cytotoxic and antitumor activities of bark extract *Streblus asper*. Lour“*Bangladesh J. Bot.* 42(1): 17-2”,2013. h. 17.
- Alluri V. Krishnaraju, *et.,al*, “Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay” *International Journal of Applied Science and Engineerin*, 2005, h. 126.
- AlQur'anul karim, *Al Quran dan Terjemahnya*. Jakarta: Departemen Agama RI, 1985.
- Anonim, *Pohon Gofasa, Gupasa, atau Kayu Bitti (Vitex cofassus)*.
- Anonim, *Sekilas Tentang Kayu Bitti (Vitex Cofassus) atau New Guinea Teak*.
- Anonim, *Vitex cofassus Reinw. ex Blume*,
- Bagya, S. Kavitha, P.V. Rajashree dan Kishore Gnana Sam, “Preliminary Anticancer Screening and Standardization of some Indigenous Medicinal Plants using Cell-biology and Molecular Biotechnology Based Models”*Journal of Medicinal Plant*, 5: 728-737”, 2011.
- Bertomi Ridho Panjaitan , “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiae cortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BST)*”, (*Skripsi Sarjana*, Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, 2011), h. 6.
- Bhatt, Shashank dan Suresh Dhyani,“ Quantification of Secondary Metabolites from *Ziziphus mauritiana* Lam. Bark “*International Journal of Bio-Technology and Research (IJBTR) ISSN 2249-6858 Vol. 3, Issue 2*”,2013. h. 1.
- Chasanah U, *et.,al*. “Anti Cancer Pre-Screening for Several Plant Using Brine Shrimp Lethality Test”, *Jurnal Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang*. h. 1.
- Dewi, Astuti dan Warditiani,“ Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostanal.*). “*Jurnal*”, h. 15”.

- Dirjen POM, *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 1979.
- Endro, Agung Nugroho dan Gemini Alam, “Review Tanaman Obat Legundi (*Vitex Trifolia* L.)”,
- Eva, Julianti, *et.,al*, “Isolasi Senyawa Flavonoida dari Daun Tumbuhan Jati Putih (*Gmelina arborea* Roxb.)”, *Jurnal Saintia Kimia*. vol. 1 no. 1, 2012, h. 29.
- Gusmiaty, Muh. Restu dan Ira Pongtuluran, “Seleksi Primer Untuk Analisis Keragaman Genetik Jenis Bitti (*Vitex Coffassus*)”, *Jurnal Perennial* ISSN: 1412-7784. vol. 8 no. 1, 2012, h. 25.
- Harbone, J.B, *Phytochemical Methods*, terj. Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. *Metode Fitokimia*, Bandung: ITB, 1987.
- Herna'ndez, M.M, *et.,al*, “Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae), *J. of Ethnopharmacol* “ *Jurnal*, 1999.
- Ikawati, Muthi, *et.,al*. “Pemanfaatan Benalu Sebagai Agen Antikanker”, *Jurnal*. h. 1.
- Ilyas, Asriyani, *Kimia Organik Bahan Alam*. Makassar: Alauddin University Press, 2013.
- Kamilah Elok Hayati dan Nurhalimah, “Pytochemical Test and Brine Shrimp Lethality Test Against *Artemia salina* Leach of Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) Plant Extract “ *Alchemy*. Vol. 1, no.2, 2010, h. 81.
- Lenny, Sovia “Senyawa Flavonoid, Fenilpropanoid dan alkaloid”, *Artikel Ilmiah*, 2006.
- Lenny, Sovia “Makalah Terpenoida dan Steroida”, *Artikel Ilmiah*, 2006.
- Li, W.X, *et.,al*, “Flavonoids from *Vitex trifolia* Inhibit Cell Cycle Progression at G2/M phase and Induce Apoptosis in Mammalian Cancer Cells”, *J Asian Nat* (2005). h. 615.
- Lisdawati Vivi, Sumali Wiryowidagdo L.Broto S. kardono, “Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)” *Bul. Penel. Kesehatan*, vol. 34, no. 3 (2006), h. 112.

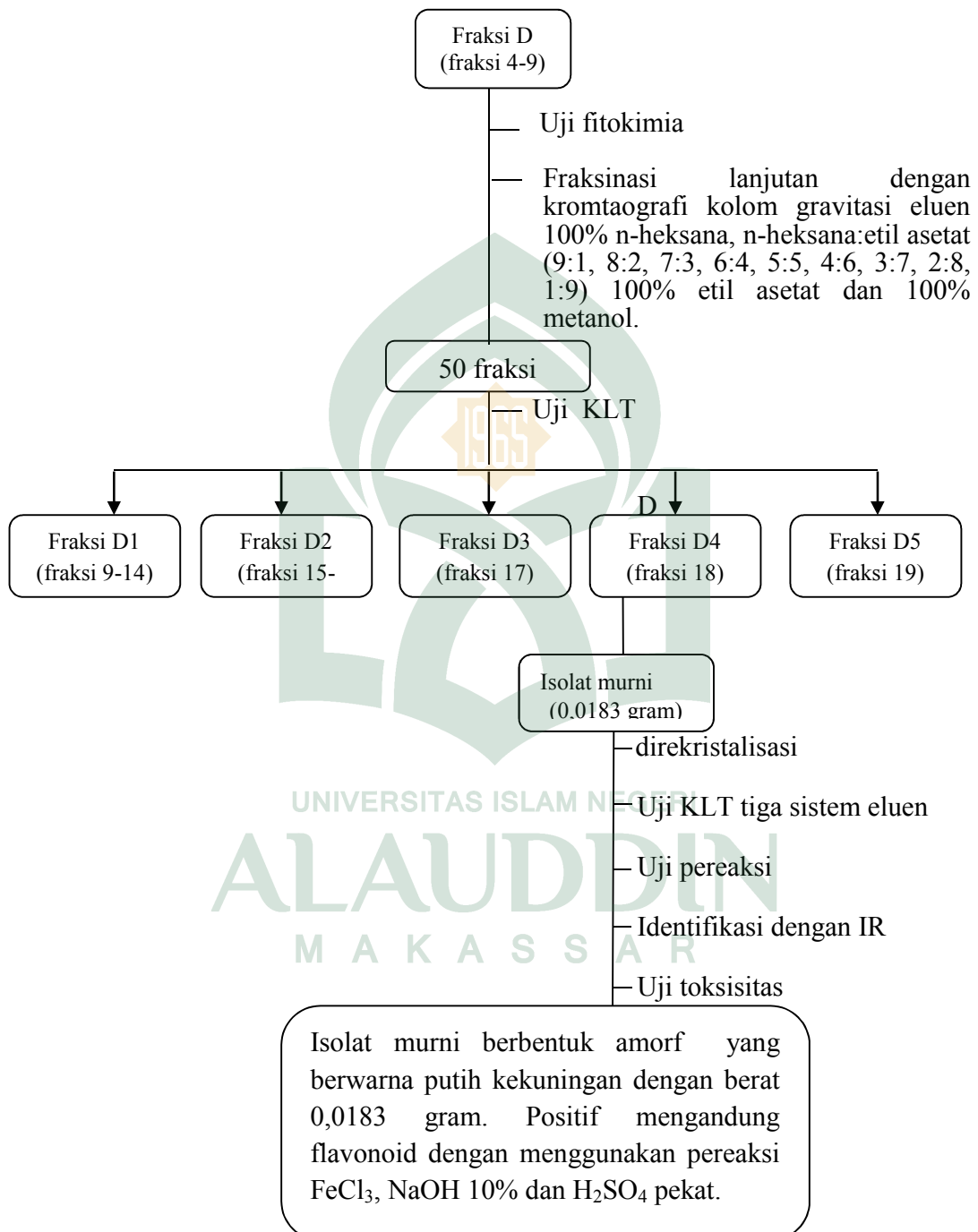
- Mardawati, Efri.,*et.al*,“ Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L*) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya “*Laporan Akhir Penelitian-Penelitian Peneliti Muda UNPAD*”, h. 10.
- Marlinda Mira, Meiske S. Sangi dan Audy D. Wuntu. “ Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.)” *Jurnal MIPA Unsrat Online*. (2012). h. 26.
- Muaja, D Arter, Harry S. J. Koleangan dan Max R. J. Runtuwene,“ Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi.”*Jurnal MIPA Unsrat Online*2(2) 115-118”, 2013. h. 115.
- National cancer Institute at the National Institutes of Health*, “Cancer”, 2014.
- Nuri, *et.,al*, “Aktivitas Antimalaria Ekstrak Metanol Dan Fraksi Kloroform Buah *Duranta Repens L*. Pada Mencit Yang Diinfeksi *Plasmodium Berghei*” *Jurnal Sainstek*, vol. 8, no.1 (2009). h. 17.
- Olowa , Lilybeth F. dan Olga M. Nuñez,“ Brine Shrimp Lethality Assay of the Ethanolic Extracts of Three Selected Species of Medicinal Plants from Iligan City, Philippines”*International Research Journal of Biological Sciences Vol. 2*(11), 74-77, ISSN 2278-3202”, 2013. h. 74.
- Pereira, Carvalho dan Meireles, “Anticancer Activity of *Tabernaemontana catharinensis* extract Obtained by supercritical Fluid Extraction”, *Rev. Bras.Pl. Med., Botucatu Brasil*, v.8, n.4, 2006. h. 144.
- Prasetyawati, Andriyani “*Eksplorasi Benih Bitti (Vitex Cofassus) Di Sulawesi Selatan*”, 2013.
- Puji, Awik Dyah Nurhayati, Nurlita Abdulgani dan Rachmat Febrianto, “Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap *Artemia Salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker” *Akta Kimindo Vol. 2 No. 1*”,2006, h. 118.
- Raina, *Tanaman Obat Untuk Kesehatan*. Yogyakarta: Absolut, 2011.
- Ruiz Jorge, Mentor dan Freeman, “A Preliminary Phylogeny of New World Verbenaceae Based on nrDNA sequences”, *Phylogeny of New World Verbenaceae*. h. 3

- Risky Ercila Rolliana, "Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kamboja Skrining Awal Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria alba l.*) terhadap Larva *Artemia Salina leach* dengan Metode Brine Shrimp Lethality test (BST) ", *Artikel Karya Tulis Ilmiah.* (2010)".
- Sastrohamidjojo, Hardjono. *Kromatografi.* Yogyakarta : Liberty, 2007.
- Septyaningsih, Dyah "Isolasi Dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.)" *Skripsi* (2010). h. 10.
- Shihab, M. Quraish, *Tafsir Al Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al quran.* Jakarta: Lentera Hati. 2002.
- Sirait Midian *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi.* Bandung: ITB, 2007.
- Srisadono, Arya, "Skrining Awal Ekstrak Etanol Daun Sirih (*piper betle* linn) Sebagai Antikanker dengan Metode Brine Shrimp Lethality Tes (BLT)", *Artikel Karya Tulis Ilmiah.* (2008).
- Suhrman Shinta, *et.,al*, "Uji Toksisitas Ekstrak Lempuyung Gajah (*Zingiber zerumbet*) terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach)", *Bul. Littro*, vol. XVII, no. 1, h. 31.
- Supratman, Unang. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik Metode Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik.* Bandung: Widya Padjajaran, 2010.
- Wardah, "Isolasi, Uji Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Fraksi Etil Asetat pada Ekstrak Tanaman *Acalypha indica* Linn.", (*Skripsi Sarjana*, Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Depok, Depok, 2012), h. 10-11.
- Watson, L. dan MJ Dallwitz, "Verbenaceae",
- Wiji Nolika Jayanti, *et.,al*, "Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Aktif dari Ekstrak Metilena Klorida (MTC) Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* (l)willd)", *Chem. Prog. Vol. 5, No.2*, 2012. h. 102.
- Yusro, Fathul, "Rendemen Ekstrak Etanol dan Uji Fitokimia Tiga Jenis Tumbuhan Obat Kalimantan Barat(Rendement of Ethanol Extracts and Phytochemical Tests In Three of Species Medicinal Plants of West Borneo) "*Jurnal*", h. 32.
- Zenta, Firdaus, *Laporan Hibah Penulisan Buku Ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik.* Makassar: Unhas, 2011.

**Lampiran 1: Diagram Alir Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Antikanker dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*)**



### Lanjutan Fraksinasi Lanjutan (Kromatografi Kolom Gravitasi)



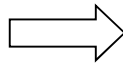


## LAMPIRAN II: Dokumentasi Penelitian

### 1. Ekstraksi



Kulit Batang Kayu Bitti  
(*Vitex cofassus*)



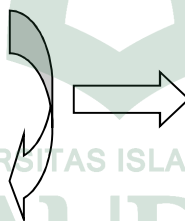
Pengeringan sampel



Sampel ditimbang sebanyak 1000 gram



Proses maserasi dengan pelarut  
Etanol selama 1x24 jam (3 kali)



Maserat Hasil Maserasi

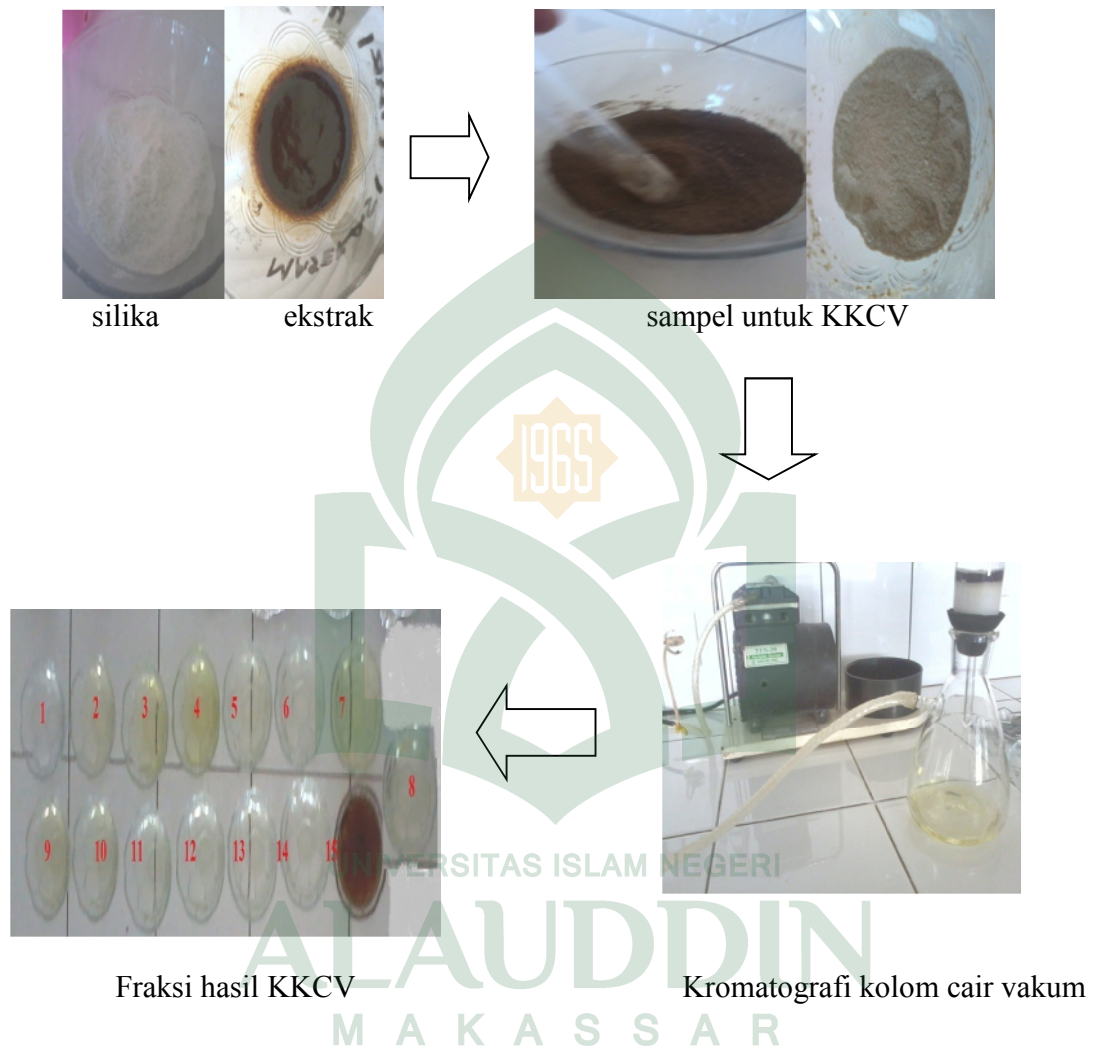


Pemekatan dengan rotary evaporator



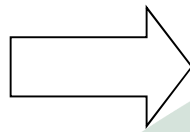
Ekstrak kental

## 2. Fraksinasi

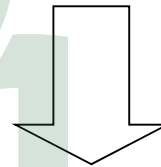




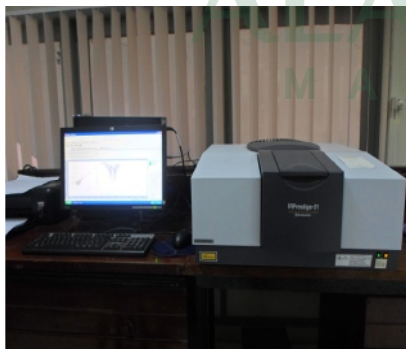
Fraksi gabungan



Kromatografi kolom gravitasi

**d. Identifikasi**

isolat murni



Spektofotometer FTIR

### e. Uji Toksisitas



Penetasan telur udang *Artemia salina* Leach  
Selama 2x24 jam

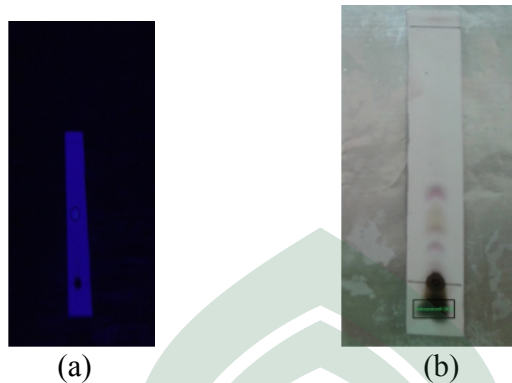


pengujian Larva dengan sampel  
selama 1x24 jam



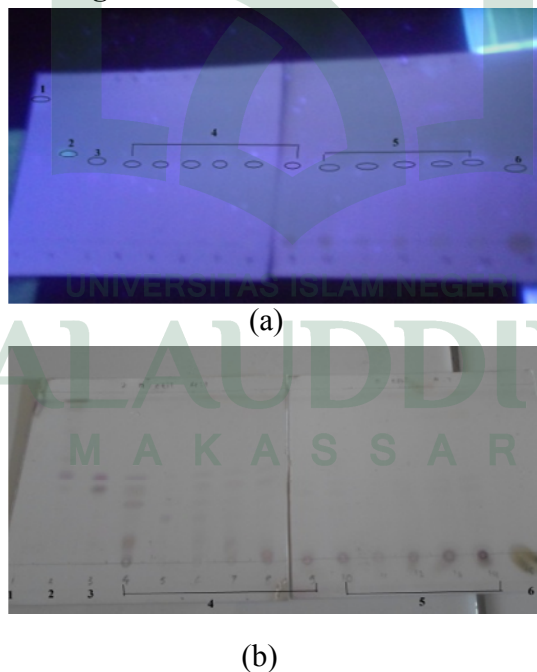
Proses hitung larva udang *Artemia salina* Leach yang hidup dan mati

**LAMPIRAN 3: Hasil KLT Ekstrak Kental Etanol Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*)**



KLT ekstrak kental eluen n-heksana:etil asetat (8:2)  
 (a) Penyinaran dengan lampu UV 254-366 nm, (b) penampak noda  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%

**LAMPIRAN 4: Kromatogram KLT 15 Fraksi hasil Fraksinasi Awal (KKCV)**



KLT 15 fraksi hasil fraksinasi eluen n-heksana:etil asetat (8:2)  
 (a) Penyinaran dengan lampu UV 254-366 nm, (b) penampak noda  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%

#### LAMPIRAN 5: Kromatogram Hasil KLT satu Noda Kristal



KLT kristal hasil kromatografi kolom gravitasi  
eluen n-heksana:etil asetat (7:3)  
penampak noda  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%

#### LAMPIRAN 6: Kromatogram Kristal Uji Tiga Sistem Eluen



(a)



(b)



(c)

Kromatogram Hasil KLT uji Tiga Sistem Eluen (a) eluen heksana: etil asetat (7:3) Rf 0,27 (b) eluen heksana:kloroform (5:5) Rf 0,72 dan (c) eluen kloroform: etil asetat (2:8) Rf 0,9



**LAMPIRAN 7: Tabel Hasil Uji Fitokimia Ekstrak kental, Fraksi D dan Kristal Murni**

No.	Sampel	Pereaksi	Hasil	Keterangan
1.	Ekstak kental	FeCl <sub>3</sub> 5 %	Larutan Biru Kehitaman	(+) Flavonoid
		NaOH 10 %	Kuning Tua	(+) Flavonoid
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	Merah tua	(+) Flavonoid
		Mayer	Endapan putih larutan coklat	(+) Alkaloid
		Wagner	Larutan jingga tua Endapan coklat	(+) Alkaloid
		Dragendorff	Larutan coklat	(+) Alkaloid
		Liebermann-Burchard	Larutan coklat	(-) terpenoid dan steroid
2.	Fraksi D	FeCl <sub>3</sub> 5 %	Larutan hijau tua	(+) Flavonoid
		NaOH 10 %	Larutan Kuning muda	(+) Flavonoid
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	Larutan Merah muda	(+) Flavonoid
		Mayer	Endapan putih larutan putih kekuningan	(+) Alkaloid
		Wagner	Larutan jingga Endapan coklat	(+) Alkaloid
		Dragendorff	Larutan kuning muda	(+) Alkaloid
		Liebermann-Burchard	Larutan coklat muda	(-) terpenoid dan steroid
3.	Isolat murni	FeCl <sub>3</sub> 5 %	Larutan hijau kekuningan	(+) Flavonoid
		NaOH 10 %	Larutan Kuning muda	(+) Flavonoid
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	Larutan kuning tua	(+) Flavonoid
		Mayer	Larutan tidak berwarna	(-) Alkaloid
		Wagner	Larutan jingga tidak ada endapan	(-) Alkaloid
		Dragendorff	Larutan tidak berwarna	(-) Alkaloid
		Liebermann-Burchard	Larutan coklat muda	(-) terpenoid dan steroid

## LAMPIRAN 8: Gambar Uji Fitokimia Ekstrak Kental, Fraksi D dan Kristal Murni

### 1. Ekstrak Kental



### 2. Fraksi D



### 3. Isolat Murni



## LAMPIRAN 9: Tabel Hasil Fraksi Hasil Fraksinasi Kromatografi Kolom Cair Vakum

No.	Eluen	Warna Fraksi
1.	n-heksana 100%	Larutan tidak berwarna
2.	n-heksana-etil asetat (9:1)	Larutan kuning muda
3.	n-heksana-etil asetat (9:1)	Larutan kuning muda
4.	n-heksana-etil asetat (8:2)	Larutan kuning kehijauan
5.	n-heksana-etil asetat (8:2)	Larutan kuning kehijauan
6.	n-heksana-etil asetat (8:2)	Larutan bening kehijauan
7.	n-heksana-etil asetat (7:3)	Larutan kuning muda
8.	n-heksana-etil asetat (6:4)	Larutan kuning muda
9.	n-heksana-etil asetat (5:5)	Larutan kuning muda
10.	n-heksana-etil asetat (4:6)	Larutan hijau kekuningan
11.	n-heksana-etil asetat (3:7)	Larutan kuning muda
12.	n-heksana-etil asetat (2:8)	Larutan kuning muda
13.	n-heksana-etil asetat (1:9)	Larutan hijau kekuningan
14.	100% etil asetat	Larutan hijau kekuningan
15.	100% metanol	Larutan coklat tua



**LAMPIRAN 10: Tabel Hasil Penggabungan Fraksi KKCV**

Kode fraksi	Fraksi yang digabung	Berat fraksi (gram)	Warna fraksi gabungan	
			Sebelum diuapkan	Setelah diuapkan
A	1	0,0155	Larutan tidak berwarna	Tidak berwarna
B	2	0,0439	Larutan kuning muda	Kuning tua
C	3	0,0547	Larutan kuning muda	Kuning kehijauan
D	4-9	0,2983	Larutan kuning kehijauan	Kuning muda
E	10-14	0,1792	Larutan coklat muda	Coklat muda
F	15	2,3197	Larutan coklat tua	coklat tua

**LAMPIRAN 11: Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Toksisitas****1. Pembuatan Larutan Stok 1000 ppm**

$$ppm = \frac{mg}{L}$$

$$\frac{200 \mu L / 250 \mu L \times 1 mg}{800 \mu L} = \frac{0,8 mg}{800 \mu L} = 0,001 \frac{mg}{\mu L} = \frac{1 mg}{mL} = 1000 ppm$$

**2. Pembuatan Larutan 500 ppm**

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$100 \mu L \times 1000 ppm = 200 \mu L \times M_2$$

$$M_2 = \frac{100.000 ppm \cdot \mu L}{200 \mu L}$$

$$M_2 = 500 ppm$$

Jadi Larutan ekstrak selanjutnya dibuat dari pengenceran larutan stok 500 ppm.

**3. Pembuatan Larutan 250 ppm**

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$100 \mu L \times 500 ppm = 200 \mu L \times M_2$$

$$M_2 = \frac{50.000 ppm \cdot \mu L}{200 \mu L}$$

$$M_2 = 250 ppm$$

Jadi Larutan ekstrak selanjutnya dibuat dari pengenceran larutan stok 250 ppm.

#### 4. Pembuatan Larutan 125 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$100 \mu L \times 250 ppm = 200 \mu L \times M_2$$

$$M_2 = \frac{25.000 ppm \cdot \mu L}{200 \mu L}$$

$$M_2 = 125 ppm$$

Jadi Larutan ekstrak selanjutnya dibuat dari pengenceran larutan stok 125 ppm.

#### 5. Pembuatan Larutan 62,5 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$100 \mu L \times 125 ppm = 200 \mu L \times M_2$$

$$M_2 = \frac{12.500 ppm \cdot \mu L}{200 \mu L}$$

$$M_2 = 62,5 ppm$$

Jadi Larutan ekstrak selanjutnya dibuat dari pengenceran larutan stok 62,5 ppm

#### 6. Pembuatan Larutan 31,25 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$100 \mu L \times 62,5 ppm = 200 \mu L \times M_2$$

$$M_2 = \frac{6.250 ppm \cdot \mu L}{200 \mu L}$$

$$M_2 = 31,25 ppm$$

Jadi Larutan ekstrak selanjutnya dibuat dari pengenceran larutan stok 31,25 ppm

#### 7. Pembuatan Larutan 15,625 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$100 \mu L \times 31,25 ppm = 200 \mu L \times M_2$$

$$M2 = \frac{3.125 \text{ ppm} \cdot \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}}$$

$$M2 = 15,625 \text{ ppm}$$

Jadi Larutan ekstrak selanjutnya dibuat dari pengenceran larutan stok 15,625 ppm

### 8. Pembuatan Larutan 7,8125 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$100 \mu\text{L} \cdot 15,625 \text{ ppm} = 200 \mu\text{L} \times M_2$$

$$M2 = \frac{1.562 \text{ ppm} \cdot \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}}$$

$$M2 = 7,8125 \text{ ppm}$$

Jadi Larutan ekstrak selanjutnya dibuat dari pengenceran larutan stok 7,8125 ppm

### LAMPIRAN 12: Tabel Probit untuk Uji Toksisitas

Probit sesuai banyaknya persen<sup>85</sup>

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
0,0		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

<sup>85</sup>Dirjen POM, *Farmakope Indonesia Edisi III* (Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 1979), h. 871.

### LAMPIRAN 13: Tabel Uji Toksisitas larva

#### 1. Ekstrak Kental

Blok	1			2			3		
	Awal	hidup	mati	Awal	hidup	Mati	Awal	hidup	mati
A	8	-	8	8	-	8	10	1	9
B	8	1	7	7	-	7	12	1	11
C	9	1	8	7	2	5	7	-	7
D	10	2	8	7	2	5	9	2	7
E	9	3	6	9	2	7	7	2	5
F	8	5	3	7	3	4	10	4	6
G	9	5	4	10	5	5	9	5	4

#### 2. Fraksi D

Blok	1			2			3		
	awal	hidup	mati	Awal	hidup	Mati	awal	hidup	mati
A	8	1	7	9	-	9	7	-	7
B	8	1	7	12	1	11	7	1	6
C	13	3	10	13	1	12	8	2	6
D	8	2	6	11	2	9	9	2	7
E	8	4	4	9	4	5	8	4	4
F	13	5	8	7	5	2	8	5	3
G	7	5	2	11	6	5	10	7	3

#### 3. Isolat murni

Blok	1			2			3		
	awal	hidup	mati	Awal	hidup	mati	awal	hidup	mati
A	11	1	10	11	-	11	10	-	10
B	12	1	11	12	1	11	12	-	12
C	11	2	9	13	1	12	13	1	12
D	13	4	9	14	3	11	13	3	10
E	9	4	5	12	4	8	13	3	10
F	10	6	4	11	5	6	11	6	5
G	12	8	4	12	6	6	11	7	4

# LAMPIRAN 14: Perhitungan Persen (%) Kematian (Mortalitas)

## 1. Ekstrak kental

Blok	Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva uji	Jumlah Larva yang Mati	% Kematian
A	500	26	25	96,1%
B	250	27	25	92,5%
C	125	23	20	86,9%
D	62,5	26	20	76,9%
E	31,25	25	18	72%
F	15,625	25	13	52%
G	7,8125	28	13	46,4%

### a. Konsentrasi 500 ppm

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{25}{26} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 96,1 \%$$

### b. Konsentrasi 250 ppm

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{25}{27} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 92,5\%$$

**c. Konsentrasi 125 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{20}{23} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 86,9\%$$

**d. Konsentrasi 62,5ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{20}{26} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 76,9\%$$

**e. Konsentrasi 31,25 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{18}{25} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 72 \%$$

**f. Konsentrasi 15,625 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{13}{25} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 52\%$$

**g. Konsentrasi 7,8125 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{13}{28} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 46,4\%$$

**2. Fraksi D**

Blok	Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva uji	Jumlah Larva yang Mati	% Kematian
A	500	24	23	95,8%
B	250	27	24	88,9%
C	125	34	28	82,3%
D	62,5	28	22	78,6%
E	31,25	25	15	60%
F	15,625	28	13	46,4%
G	7,8125	28	10	35,7%

**a. Konsentrasi 500 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{23}{24} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 95,8 \%$$

**b. Konsentrasi 250 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{24}{27} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 88,9\%$$

**c. Konsentrasi 125 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{28}{34} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 82,3\%$$

**d. Konsentrasi 62,5ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{22}{28} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 78,6\%$$

**e. Konsentrasi 31,25 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{15}{25} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 60 \%$$

**f. Konsentrasi 15,625 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{13}{28} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 46,4\%$$



**g. Konsentrasi 7,8125 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{10}{28} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 35,7\%$$

**3. Isolat murni**

Blok	Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva uji	Jumlah Larva yang Mati	% Kematian
A	500	32	31	96,8%
B	250	36	34	94,4%
C	125	37	33	89,1%
D	62,5	40	30	75%
E	31,25	34	23	67,6%
F	15,625	32	15	46,8%
G	7,8125	35	14	40%

**a. Konsentrasi 500 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{31}{32} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 96,8\%$$

**b. Konsentrasi 250 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{34}{36} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 94,4\%$$

**c. Konsentrasi 125 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{33}{37} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 89,1\%$$

**d. Konsentrasi 62,5ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{30}{40} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 75\%$$

**e. Konsentrasi 31,25 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{23}{34} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 67,6\%$$

**f. Konsentrasi 15,625 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = \frac{15}{32} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 52\%$$

**g. Konsentrasi 7,8125 ppm**

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

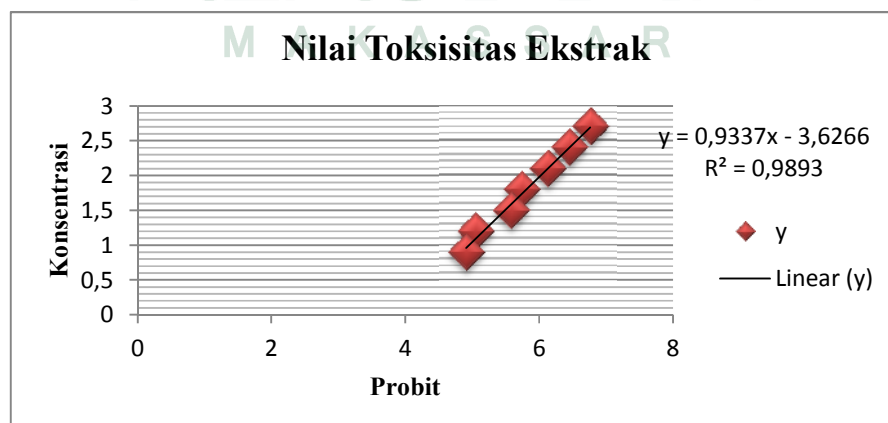
$$\% \text{ kematian} = \frac{14}{35} \times 100\%$$

$$\% \text{ kematian} = 40\%$$

**LAMPIRAN 15: Perhitungan Uji Toksisitas**

**1. Ekstrak Kental**

No.	Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	% Kematian	Nilai Probit
1.	500	2,69	96,1 %	6,763
2.	250	2,39	92,5 %	6,445
3.	125	2,09	86,9 %	6,125
4.	62,5	1,79	76,9 %	5,737
5.	31,25	1,49	72 %	5,58
6.	15,625	1,19	52 %	5,05
7.	7,8125	0,89	46,4%	4,908



Jadi nilai  $LC_{50}$  :

$$y = ax + b$$

dimana  $y = 5$

$$5 = 0,933x + 3,626$$

$$x = \frac{5 - 3,626}{0,933}$$

$$x = \frac{1,374}{0,933}$$

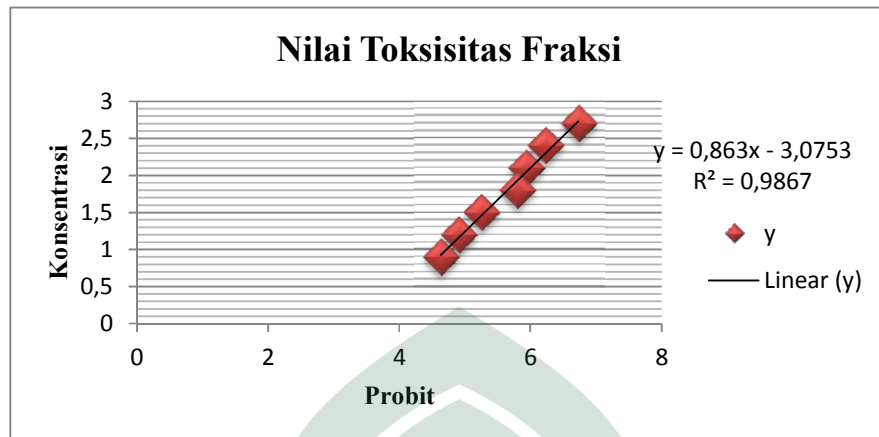
$$x = 1,47$$

$$\text{anti log } 1,47 = 29,51$$

Jadi nilai  $LC_{50}$  dari ekstrak kental adalah 29,51 ppm.

## 2. Fraksi D

No.	Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	% Kematian	Nilai Probit
1.	500	2,69	95,8 %	6,728
2.	250	2,39	88,9 %	6,225
3.	125	2,09	82,3 %	5,929
4.	62,5	1,79	78,6 %	5,794
5.	31,25	1,49	60 %	5,25
6.	15,625	1,19	46,4 %	4,908
7.	7,8125	0,89	35,7 %	4,631



Jadi nilai  $LC_{50}$  :

$$y = ax + b$$

dimana  $y = 5$

$$5 = 0,863x + 3,075$$

$$x = \frac{5 - 3,075}{0,863}$$

$$x = \frac{1,925}{0,863}$$

$$x = 2,23$$

$$\text{anti log } 2,23 = 169,82$$

Jadi nilai  $LC_{50}$  dari fraksi D adalah 169,82 ppm.

### 3. Kristal Murni

No.	Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	% Kematian	Nilai Probit
1.	500	2,69	96,8 %	6,854
2.	250	2,39	94,4 %	6,586
3.	125	2,09	89,1 %	6,235
4.	62,5	1,79	70 %	5,67
5.	31,25	1,49	67,6 %	5,458
6.	15,625	1,19	46,8 %	4,916
7.	7,8125	0,89	40 %	4,75



Jadi nilai  $LC_{50}$  :

$$y = ax + b$$

dimana  $y = 5$

$$5 = 0,795x + 2,809$$

$$x = \frac{5 - 2,809}{0,795}$$

$$x = \frac{2,191}{0,795}$$

$$x = 2,75$$

$$\text{anti log } 2,75 = 562,34$$

Jadi nilai  $LC_{50}$  dari isolat murni adalah 562,34 ppm.



## DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Penulis dengan nama lengkap Nuraini atau biasa disapa Aini lahir di Paradowane kabupaten Bima tanggal 11 Mei 1992. Penulis merupakan putri pertama dari pasangan bapak Yahya dan Ibu Suhartati. Penulis mulai menempuh pendidikan di SDN paradowane tahun 1998 sampai tahun 2004.

Pada tahun yang sama penulis melanjutkan pendidikan tingkat menengah di MTsN Model Kota Bima dan selesai pada tahun 2007. Penulis melanjutkan ke sekolah Menengah Atas di SMAN 1 Kota Bima sampai tahun 2010. Penulis melanjutkan pendidikan di jenjang Strata Satu di Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar melalui jalur masuk Ujian Masuk Lokal (UML) dengan pilihan jurusan Farmasi dan Kimia dan alhamdulillah penulis lulus di jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.

Selama kuliah penulis aktif dalam berbagai organisasi yaitu Ikatan Mahasiswa (IMPAR) Bima Makassar sebagai Bendahara Umum periode tahun 2012-2013 dan Himpunan Mahasiswa Jurusan Kimia (HMJ) Kimia sebagai Wakil Bendahara Umum Periode 2012-2013. Penulis juga aktif sebagai Asisten Laboratorium Periode 2012-2014 dalam mata kuliah Praktikum Kimia Dasar 1, Praktikum Kimia dasar 2, Praktikum Kimia Fisika 1, Praktikum Kimia Fisika 2, Praktikum Kimia Analitik, Praktikum Kimia Anorganik dan Praktikum Kimia Organik. Penulis alhamdulillah menyelesaikan studi S1 Kimia tepat pada hari Kamis tanggal 11 Desember 2014. Semoga hasil penelitian penulis yang berjudul "Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Antikanker dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*)" bermanfaat bagi orang banyak.